

N° D'ORDRE : 140

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE LYON

POUR OBTENIR

LE TITRE DE DOCTEUR ES-SCIENCES NATURELLES

PAR

Daniel VINCENT

CHEF DE TRAVAUX A LA FACULTÉ DE MÉDECINE

1^{re} Thèse : L'Acétylcholine et son rôle dans l'organisme animal.

2^e Thèse : Propositions données par la Faculté.

Soutenues en 1938 devant la Commission d'examen :

MM. CARDOT *Président*

DOUIN

FROMAGEOT

} *Membres du Jury*

IMPRIMERIE DE TRÉVOUX

G. Patisier

1938

L'ACETYLCHOLINE
et son rôle dans l'organisme animal



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41552405_0034

N° D'ORDRE : 140

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE LYON

POUR OBTENIR

LE TITRE DE DOCTEUR ES-SCIENCES NATURELLES

PAR

Daniel VINCENT

CHEF DE TRAVAUX A LA FACULTÉ DE MÉDECINE

1^{re} Thèse : L'Acétylcholine et son rôle dans l'organisme animal.

2^e Thèse : Propositions données par la Faculté.

Soutenues en 1938 devant la Commission d'examen :

MM. CARDOT *Président*

DOUIN

FROMAGEOT

} *Membres du Jury*

IMPRIMERIE DE TRÉVOUX

G. Patissier

—
1938

UNIVERSITE DE LYON - FACULTE DES SCIENCES

Doyen

M. LONGCHAMBON, *, ,  I., .

Assesseur

M. VANEY, *,  I., .

Professeurs honoraires

MM. VESSIOT, C. *,  I.

RIGOLLOT, *,  I.

COUTURIER, *,  I., .

Professeurs

MM. DULAC, *,  I., *Calcul différentiel et intégral.*

MEUNIER, O. *,  I., *Chimie industrielle.*

SIRE, *,  I., , *Mécanique rationnelle et appliquée.*

VANEY, *,  I., , *Zoologie.*

CARDOT, *,  I., *Physiologie générale.*

ROMAN, *,  I., *Géologie.*

LOCQUIN, *,  I., *Chimie générale.*

LONGCHAMBON, *,  I., , *Minéralogie.*

DOUIN, *,  I., *Botanique.*

DÉJARDIN, *,  I., *Physique générale.*

SOLLAUD,  I., *Zoologie.*

THIBAUD,  A., *Physique expérimentale.*

LEMARCHANDS, *,  I., *Chimie appliquée.*

EYRAUD,  I., *Mathématiques.*

FROMAGEOT,  A., *Chimie biologique.*

AUMÉRAS,  A., *Chimie physique.*

Maitres de conférences

MM. DŒUVRE,  I., *Chimie organique.*

PRETTRE, *Chimie.*

M. N., *Botanique.*



Maitres de conférences adjoints

M. BONNET, *,  I., *Zoologie générale et agricole.*

Chargés de cours complémentaires

Mlle BACHRACH,  I., *Physiologie.*

MM. DUFAY,  I., *Astronomie et Physique supérieure.*

VIRET,  I., *Etude des roches.*

RANSON, *Géométrie supérieure.*

MAYET, *,  I., , *Anthropologie.*

PELOSSE,  I., *Sériciculture.*

DARESTE DE LA CHAVANNE,  I., *Géographie physique.*

SEYEWETZ, *,  I., *Matières colorantes artificielles.*

TRONCHET,  I., *Botanique agricole*

Secrétaire

M. ROUX  A.

A MA FEMME ET A MA FILLE

A MES PARENTS

A TOUS LES MIENS ET A MES AMIS

A MES MAITRES

A MES JUGES

INTRODUCTION

« Le mystère est seulement
aujourd'hui de savoir comment
l'influx nerveux agit sur un
muscle »

CLAUDE BERNARD (1859).

L'ester acétique de la choline, découvert comme constituant biologique par EWINS [112] chez les Végétaux (ergot de Seigle), ne devint que plus tard la vedette de la physiologie animale moderne. Les expériences mémorables de LOEWI [232] (1921), classiques maintenant, mais si controversées dès leur publication, apportèrent une preuve éclatante du rôle important que des auteurs avaient déjà attribué à certaines substances comme intermédiaires chimiques de l'influx nerveux dans le système autonome. DALE [82] en 1914, indiquait déjà la ressemblance des effets pharmacodynamiques de l'acétylcholine et de l'excitation vagale. DIXON, dès 1907, n'avait-il pas déjà pensé que le vague libérait une substance à action muscarinique et GAUTRELET [138-139] n'attribuait-il pas à la choline, à la même époque, un rôle antagoniste du système sympathique ? Mais LOEWI [232], ayant montré la transmissibilité humorale de l'effet vagal, les chercheurs s'attachèrent alors à prouver l'identité de la substance libérée avec l'acétylcho-

line, et à montrer que cette dernière est un constituant normal des tissus animaux. En 1925, WITANOWSKI [327] réussit à la caractériser dans un extrait myocardique de Grenouille. Deux voies s'offrirent alors pour l'étude de la teneur des tissus en acétylcholine : *voie chimique* (KAPFFHAMMER et son Ecole [41-42-211], DALE et DUDLEY [85], STEDMAN [300], BACQ et MAZZA [21-22], difficile et parfois trompeuse en l'occurrence, à cause de la très faible teneur d'ester de la choline dans les tissus, même parmi les plus riches ; *voie biologique*, plus féconde parce qu'ici l'expérimentateur trouve à sa disposition des réactifs unissant à une extraordinaire sensibilité, une spécificité suffisante. L'emploi de l'ésérine, dont LOEWI et NAVRATIL [239] avaient montré l'action sensibilisante, permit de doser des quantités extrêmement faibles d'acétylcholine en se servant de préparations de cœur ou de muscle droit de l'abdomen de Grenouille (RIESSER [288], CHANG et GADLUM [69]) ou par action sur la pression artérielle du Chat (DALE [82], HUNT [171 b] et surtout sur le muscle dorsal antérieur de la Sangsue (FÜHNER [132], MINZ [255]) pour ne citer que les méthodes les plus usuelles.

Malgré les divergences, souvent très importantes, des chiffres trouvés par ces deux voies : chimique et biologique, un fait reste indubitable : la présence d'acétylcholine dans presque tous les organes animaux, aussi bien chez les Vertébrés que chez les Invertébrés (BACQ [12-13-21], GAUTRELET et ses élèves [142-77], JULLIEN avec nous-même [184-317-320, etc.]).

La présence d'un ferment hydrolysant, dans les mêmes tissus, posait alors des problèmes biologiques

loin d'être encore parfaitement résolus : choline-estérase (DALE [82], LOEWI et NAVRATIL [238], PLATTNER [276-277], AMMON [6], STEDMAN [296]) qui accompagne toujours l'acétylcholine dans les tissus qui en contiennent des quantités notables, ferment ayant la propriété de détruire l'activité de l'acétylcholine en l'hydrolysant, mais aussi probablement doué d'un pouvoir réversible de synthèse (ABDERHALDEN et PAFFRATH [1-2]).

←—————
Ester de la choline (cholinestérase) choline + acide.
—————→

tels seraient les éléments de la réaction réversible de production de l'intermédiaire cholinergique dans les tissus si les mécanismes dont nous essayons d'entrevoir la réalité se paraient d'une si grande simplicité. La complication en est beaucoup plus grande et une troisième étape dans notre connaissance de ces faits réside dans la mise en évidence d'« acétylcholine masquée », dissimulée, dans certains tissus, le tissu nerveux en particulier ; GAUTRELET et ses élèves [76-77-78] y ont récemment démontré l'existence d'un complexe libérant de l'acétylcholine par la chaleur.

Problèmes, on le voit, d'une si haute portée biologique, que nous nous sentons encore bien désarmé devant eux au début de ce modeste ouvrage. Nous n'envisagerons naturellement pas tous les aspects de cette question de façon complète, mais seulement dans la mesure où ils nous apportent des éclaircissements dans la partie personnelle originale de notre travail.

Aussi, après une *première partie*, consacrée à une *revue générale* relativement sommaire d'ailleurs, de la question : propriétés chimiques et biologiques de l'acé-

tylcholine, méthodes d'analyse, étude de la cholinestérase, répartition dans le monde animal, mode d'action et rôle des esters de la choline dans l'organisme, abordons-nous, dans une *deuxième partie*, l'exposé de nos *recherches personnelles* dans ce domaine : sur le dosage biologique de l'acétylcholine, la détermination de l'activité cholinestérasique des humeurs et tissus ; puis, sur la répartition des esters de la choline et l'activité cholinestérasique chez les Invertébrés (Mollusques et Crustacés) où nous étudierons, en particulier, le système circulatoire ; ensuite, chez les Vertébrés et dans quelques organes humains. Chemin faisant, nous donnerons nos recherches sur le mode d'action biologique de l'acétylcholine dans certains tissus : sa diffusibilité, le problème de sa coexistence avec la cholinestérase dans les organes ; nous envisagerons enfin, des essais d'inactivation de l'estérase *in vivo* par action pharmacodynamique (ésérine), et nous apporterons quelques données sur le problème de la fixation de l'acétylcholine et de sa destinée dans les tissus, après injections médicamenteuses importantes de chlorure d'acétylcholine par voie sous-cutanée.

Qu'il nous soit permis au début de ce travail de remercier notre Maître, Monsieur le Professeur H. CARDOT, dont les conseils nous furent si précieux dans nos recherches. Au laboratoire de Physiologie générale de la Faculté des Sciences de Lyon, nous avons toujours trouvé l'appui de sa haute compétence dans ces délicates questions. Les ressources de la Station maritime de Biologie de Tamaris, qu'il dirige, nous furent, grâce

à lui, constamment prodiguées. Nous lui exprimons notre très respectueuse gratitude pour le grand honneur qu'il nous fait en acceptant la présidence de cette thèse.

Que Messieurs les Professeurs DOUIN et FROMAGEOT qui sont nos juges veuillent bien trouver ici nos sentiments de reconnaissance.

Notre Maître, Monsieur le Professeur G. FLORENCE, dont nous avons le bonheur d'être depuis de nombreuses années déjà le collaborateur à la Faculté de Médecine et dont la bienveillance fut toujours sans bornes à notre égard, voudra bien accepter ce travail en hommage de notre respectueux et dévoué attachement.

Nous sommes grandement redevable à Monsieur le Professeur A. JULIEN de l'inspiration de cet ouvrage à la partie expérimentale duquel il a collaboré constamment avec une inlassable activité. Nous ne saurions lui exprimer assez vivement notre cordiale reconnaissance.

Notre gratitude va aussi à Monsieur le Professeur H. HERMANN, à Messieurs les Professeurs agrégés J. ENSELME et G. MORIN pour l'amical intérêt qu'ils ont toujours porté à nos recherches. Merci enfin à nos jeunes collaborateurs du laboratoire de Physiologie M. BOUCHET et Mlle M. VUILLET, dont l'aide assidue nous fut précieuse en maintes circonstances (1).

(1) Nous sommes très reconnaissant à Monsieur le Président et à Messieurs les membres du Conseil d'Administration de la Caisse nationale de la Recherche Scientifique, pour l'aide qu'ils nous ont accordée en vue de poursuivre nos travaux.

PREMIÈRE PARTIE

Revue générale de la question

Dans cet exposé, nous nous proposons de donner une étude d'ensemble :

1° Des procédés d'extraction et de dosage de l'acétylcholine dans les tissus animaux.

2° De sa répartition dans l'organisme animal, selon les organes, chez les Vertébrés et chez les Invertébrés.

3° De son mode d'action, son rôle, son origine et sa destinée, en insistant particulièrement sur l'activité fermentaire cholinestérasique des tissus.

CHAPITRE PREMIER

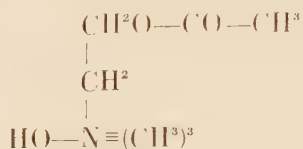
Des procédés d'extraction et de dosage de l'acétylcholine dans les tissus animaux

Qu'il s'agisse de l'extraction d'abord, du dosage ensuite, les procédés utilisés découlent des propriétés chimiques et biologiques de l'acétylcholine, propriétés qui ont été précisées par de très nombreux travaux.

PROPRIÉTÉS CHIMIQUES

N'insistons que sur les principales, les plus essentielles à la conservation et à la stabilité du produit lors de son extraction, et les plus spécifiques quant à sa précipitation ultérieure.

L'acétylcholine, ester acétique de la choline, et dont la formule est représentée par :



base forte, se rencontre dans les tissus sous forme de sels facilement dissociables : chlorure d'acétylcholine.

L'acétylcholine base, ainsi que ses sels principaux (chlorure, bromure, etc.) est très soluble dans l'eau : elle a même d'intenses propriétés hygroscopiques ; ses cristaux, à l'air libre, fixent rapidement l'eau de l'atmosphère et deviennent déliquescents (fait d'une importance primordiale pour la préparation des solutions étalons). En solution aqueuse diluée, l'acétylcholine s'hydrolyse très rapidement et presque instantanément en milieu fortement alcalin ($\text{NaOH}-\text{N}$) plus lentement en milieu neutre ; par contre, l'acidité est très favorable à la conservation ; à $\text{pH} = 3,9$, selon HOFFMANN [167], la stabilité des solutions aqueuses est maxima et leur conservation presque indéfinie. L'acidité empêche, à la fois, l'hydrolyse spontanée de l'acétylcholine et son hydrolyse biologique fermentaire par la cholinestérase. Signalons que pour empêcher toute hydrolyse, les solutions injectables, utilisées en thérapeutique sont faites en milieu anhydre : mono et diacétine de la glycérine ; mono-acétate du glycol, diéthylène-glycol ou lactate d'éthyle (LEMATTE, BOINOT, E. et M. KAHANE [224])

Soluble dans l'alcool éthylique, l'acétone, le chloro-

forme, l'acide acétique, elle ne l'est ni dans l'éther, ni dans la benzine.

Ni l'acide trichloracétique, ni l'acide métaphosphorique ne la précipitent. Par contre, les acides phosphotungstique (E. et M. KAHANE), silicotungstique et perchlorique, ce dernier moins intensément, donnent des composés insolubles (LEMATTE, BOINOT, E. et M. KAHANE [225], KAHANE et J. LÉVY [198]. Le réactif iodo-ioduré donne un précipité de globules huileux brun foncé :



ne présentant jamais l'aspect cristallin obtenu avec la choline elle-même (cristaux de FLORENCE). Le sel de REINECKE (chromi - diammonio - tétrasulfocyanure d'ammonium de formule $[\text{Cr}(\text{NH}^3)^2(\text{SCN})^4] \text{NH}^4, \text{H}^2\text{O}$ insolubilise l'acétylcholine sous forme de « reineckate » :

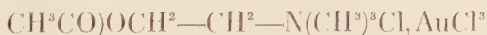


de même d'ailleurs que la choline en un précipité dont la cristallisation et le point de fusion diffèrent selon qu'il s'agit de l'alcool ou de son ester (BISCHOFF, GRAB et KAPFLAMMER [41-42] KAHANE [194]).

Enfin, le chlorure mercurique, le chlorure de Pt, le chlorure d'Au donnent des précipités de chloromercure, chloroplatinate :



chloroaurate :



(GULEWITCH [157], NOTHNAGEL [271], EWINS [112], JONES et MAJOR [176], DUDLEY [99-100]) Ce dernier

a identifié un choroplatinate double de choline et d'acétylcholine (1).



MÉTHODES D'EXTRACTION

Nous nous attarderons peu sur elles. De nombreux auteurs ont préconisé l'emploi de l'alcool (EWINS [112], ENGELHART [109], WITANOWSKI [327], DALE et DUDLEY [85]), ou mieux l'alcool chlorhydrique N/100 (LEMATTE. BOINOT et KAHANE [224], ou l'alcool sulfurique (CHANG et GADDUM [69]) pour la raison signalée plus haut. L'emploi de l'acétone aurait selon KAHLSON [208], un avantage de rapidité dans l'évaporation de l'extrait.

Parmi les acides en solution aqueuse, à côté de l'acide métaphosphorique (BISCHOFF, GRAB et KAPFHAMMER [41]) on utilise surtout l'acide trichloracétique à 10 % (GALEHR et PLATTNER [137]. CHANG et GADDUM [69] emploient la technique suivante : les tissus pesés sont broyés dans l'acide trichloracétique à 10 % ; après un certain temps de contact et filtration, l'excès d'acide trichloracétique est éliminé par agitation avec l'éther à 4 ou 5 reprises et décantation. L'extrait ainsi obtenu, concentré dans le vide, servira soit à l'identification, soit au dosage chimique ou biologique.

(1) Pour les caractéristiques et les points de fusion donnés par les divers auteurs sur ces formes d'insolubilisation de l'A. C., on pourra se reporter au traité de M. GUGGENHEIM : « Les amines biologiques », Paris, Baillière, 1934, et à l'article de E. KAHANE et J. LEVY : « Caractérisation et dosage de l'acétylcholine dans les substances biologiques », *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1936, 18, 505.

Les unes ou les autres de ces techniques d'extraction qui visent à débarrasser la préparation des protéides, sans altérer l'acétylcholine sont indispensables lorsque l'on veut poursuivre sur ces extraits des dosages chimiques par précipitation. Par contre, pour le titrage biologique, on peut plus commodément et plus rapidement opérer par simple extraction aqueuse en solution de Ringer, comme CORTEGGIANI [77] l'indiqué, et comme avec A. JULLIEN, nous-même l'avons préconisé [317]. Mais, il est nécessaire de recueillir et de broyer les tissus en Ringer ésériné afin d'empêcher toute hydrolyse diastatique de l'acétylcholine et d'opérer le dosage après un temps relativement court.

Ces divers modes d'extraction ne sont cependant pas rigoureusement équivalents : on admet généralement que les extraits trichloracétiques sont plus actifs que les extraits alcooliques (CHANG et GADDUM [69], BARSOUM [24]). Pourtant, PLATTNER et TSUDZIMURA [280] avaient constaté l'inverse sur des extraits de cerveau, tandis que E. CORTEGGIANI affirme que, pour le cerveau, l'extraction trichloracétique entraîne l'acétylcholine totale, alors que le simple broyage, en milieu salin ésériné ne permet de doser directement que l'acétylcholine libre des tissus.

PROCÉDÉS CHIMIQUES D'IDENTIFICATION ET DE DOSAGE

Ils ne sont que l'application des réactions de précipitation de l'acétylcholine énoncées plus haut. Sur le liquide d'extraction désalbuminé et concentré, on fait agir les réactifs précipitants : tétrachlorure de Pt, chlo-

rure d'Au, sel de Reinecke, acides perchlorique, phosphotungstique ou silicotungstique. Les précipités obtenus, purifiés et recristallisés servent à l'identification, par leur mode de cristallisation, leur point de fusion, et leur analyse élémentaire. La pesée du précipité permet un dosage précis.

Pour l'identification, les procédés les plus en faveur, parce que permettant le mieux de distinguer l'acétylcholine de la choline, sont les suivants : l'emploi du sel de REINECKE grâce auquel on peut obtenir facilement avec l'acétylcholine des cristaux en navette, caractéristiques, de $PF = 173^\circ$, alors que le reineckate de choline fond à 250° (BISCHOFF, GRAB et KAPFHAMMER [41-211] et d'autre part, l'utilisation du chlorure d'Au. Les chloroplatinates sont des dérivés beaucoup moins caractéristiques et beaucoup moins spécifiques. DUDLEY [100] en a donné une étude très documentée.

Pour le dosage, la plupart des auteurs se servent de la technique de KAPFHAMMER et BISCHOFF [211] : elle comporte, après extraction alcoolique et trichloracétique, une première séparation de la choline et de ses esters par une solution saturée de sel de REINECKE, suivie de lavages à l'eau glacée, à l'alcool absolu et à l'éther. Le résidu séché dans le vide est repris par un mélange d'acétone et d'eau à p. e. Du sulfate d'Ag à 6 % ajouté précipite l'acide de REINECKE à l'état de reineckate d'Ag qu'on sépare par filtration. Par addition de $BaCl^2$, en quantité équivalente (1,025 %) on précipite Ba, SO^4 , et Ag ; le liquide clair est ensuite concentré. On traite alors par une solution saturée de $Au Cl^3$ neutralisée au rouge Congo par CO^3NaH ; il se

fait un précipité qu'on laisse cristalliser à la glacière, qu'on purifie par recristallisation, qu'on sèche, pèse, et sur lequel on fait les réactions d'identification.

BEATTIE [27] a récemment mis au point une application colorimétrique de la technique de KAPFHAMMER par appréciation de la teinte rosée donnée par le reineckate en solution acétonique.

Les phosphotungstates et silicotungstates sont préconisés par E. KAHANE et J. LÉVY [198] utilisant pour le dosage, les données de LEMATTE, BOINOT et KAHANE [225]. Ces auteurs distinguent les sels obtenus avec l'acétylcholine de ceux fournis avec la choline par la perte de poids observée à l'incinération.

A partir du *reineckate*, E. KAHANE et R. COUPECHOUX [196 bis] terminent le dosage par bromométrie : le précipité est traité à l'ébullition par la soude diluée, puis acidifié par HCl et additionné d'un excès de solution titrée de $\text{BrO}^3\text{K} - \text{KBr}$. L'excès de Br est déterminé par addition de KI et titrage par $\text{S}^2\text{O}^3\text{Na}^2$.

A partir du *periodure*, on peut titrer l'iode par l'hypo-sulfite après dissolution dans le chloroforme (SHARPE [291 bis], ROMAN [290]) mais la séparation du périodure est difficile, et cette technique ne permet pas de doser séparément choline et acétylcholine.

Signalons enfin, qu'on a préconisé une méthode de dosage alcalimétrique par saponification de l'acétylcholine à l'ébullition en présence d'un excès de NaOH qu'on titre en retour (KAHANE et J. LÉVY [198]).

Toutes ces méthodes ont l'inconvénient de nécessiter une grande quantité de matière à analyser, étant donnée la très faible teneur des organes en acétylcholine.

Aussi emploie-t-on le plus souvent des méthodes biologiques, dont certaines joignent une extraordinaire sensibilité à une spécificité réelle. Quelquefois d'ailleurs, on allie ces deux manières de faire, isolant et purifiant le produit par voie chimique, et en faisant l'essai quantitatif par voie biologique (KAHANE et J. LÉVY [198]).

PROPRIÉTÉS BIOLOGIQUES

De nombreuses méthodes ont mis à profit les réactions caractéristiques de certains organes à des doses très minimes d'acétylcholine. Ces propriétés biologiques essentielles sont les suivantes : elles concernent presque uniquement des appareils *neuro-musculaires*, dont les uns, à son contact, se relâchent, tandis que les autres entrent en contraction.

Effets inhibiteurs.

— Sur *le cœur* : action inotrope et chronotrope négatives ; pour des doses un peu plus fortes, arrêt du cœur en diastole. Effet ne se produisant pas après injection préalable d'atropine, mais au contraire augmenté par l'ésérine. La reprise des battements se fait spontanément au bout d'un certain temps.

— Action sur la *pression sanguine* qui s'abaisse, corollaire de l'effet précédent auquel s'est joint un effet périphérique sur la circulation capillaire et artériolaire.

Effets de contraction.

— Sur *l'intestin*. L'acétylcholine en élève le tonus, et en augmente le péristaltisme.

— Sur *l'utérus*. Action contracturante levée par l'atropine.

— Sur le *muscle volontaire*, qui se met en contraction, cet effet, plus accusé sur le muscle énérvé, est beaucoup augmenté par l'ésérine.

MÉTHODES BIOLOGIQUES DE DOSAGE

Cœur isolé de Grenouille.

L'effet inhibiteur de l'acétylcholine sur le cœur de Grenouille a été le test biologique le premier utilisé pour sa caractérisation. Employé dès 1906 par HUNT et de TAVEAU [172], puis par FÜHNER [130], c'est lui qui servit à LOEWI [232] pour ses remarquables expériences de transmission humorale de l'effet vagal. On emploie la technique classique de STRAUB : sur une grosse Grenouille dont on a détruit les centres nerveux, on introduit dans l'aorte une canule spéciale (canule de STRAUB) qu'on ligature. La veine cave étant liée, on isole le cœur et on le place en connexion avec le levier d'un myographe, en chambre humide. On introduit dans la canule quelques cm³ de Ringer, puis la solution à essayer. On enregistre les battements. On observe alors l'effet inotrope négatif et l'arrêt qui cède au bout

d'un temps plus ou moins long. On fait ensuite l'épreuve de l'atropine : après introduction dans la canule de Ringer contenant 1.10^{-5} d'atropine, on n'observe plus l'effet précédent (voir fig. 1).

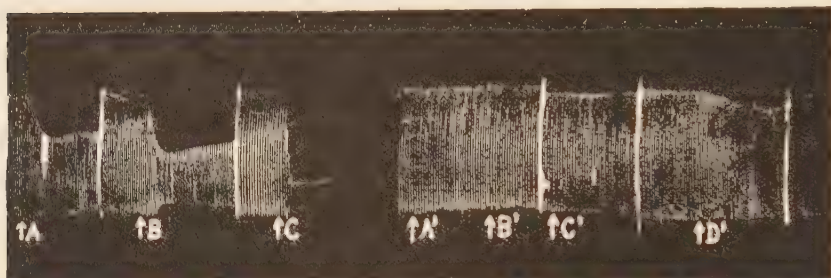


FIG. 1. — Action de l'acétylcholine sur le cœur isolé de Grenouille (technique de STRAUB), (d'après E. CORTEGGIANI).

Tracé de gauche :

A	Acétylcholine	5.10^{-10}
B	—	1.10^{-9}
C	—	5.10^{-9}

Tracé de droite : après atropine :

A'	Acétylcholine	1.10^{-7}
B'	—	1.10^{-6}
C'	—	1.10^{-5}
D'	—	1.10^{-4}

Cette technique, qui, par comparaison avec l'effet obtenu à partir de solutions-étalons d'acétylcholine, peut permettre une estimation quantitative, n'est pas très précise. Sa sensibilité est extrêmement variable selon les préparations (on peut observer une réaction pour des concentrations de 1.10^{-8} à 1.10^{-9} d'acétylcholine). Mais elle peut être perturbée par certaines sub-

stances existant dans tous les extraits de tissus animaux : ions K^+ , substance R de CHANG et GADDUM [69] qui ont une action semblable ; ions Ca^{++} , histamine qui ont un effet inverse (CLARK [72], EGGLETON [104]).

Chez les *Invertébrés* : le cœur isolé d'*Helix pomatia* a servi de test à HALPERN et CORTEGGIANI [158], mais il ne paraît pas pouvoir être utilisable pour le dosage. Avec A. JULLEN, BOUCHET et M. VUILLET [190], nous avons étudié les réactions de cet organe à diverses drogues, dont l'acétylcholine. On en trouvera plus loin l'exposé plus détaillé.

Pression sanguine.

Divers animaux ont été utilisés : le Chat (DALE [82], REID HUNT [171 b], SIMONART [292]), le Lapin (HUNT et DE TAVEAU [172], EULER et GADDUM [111], le Chien (J. LÉVY et L. OLSZYCKA [227]). On injecte préalablement une petite dose d'ésérine et on introduit l'extrait à essayer par voie intraveineuse. D'après J. LÉVY et OLSZYCKA, il est possible de doser de cette manière de 0,03 à 0,2 d'acétylcholine par kilog, sans dépasser 15 % d'erreur.

Intestin isolé.

Technique mise au point par GUGGENHEIM et LÖFFLER [156] en 1916 sur l'intestin isolé de Cobaye. D'autres auteurs emploient l'intestin de Lapin ou de Rat. Ce dernier d'après KAHLSON [208], BERNHEIM [34] serait d'une meilleure sensibilité. Mais l'ésérine occasionne à elle

seule une augmentation du tonus de l'intestin, probablement, selon MATTHIES [252], par potentialisation de l'acétylcholine que l'intestin contient normalement en assez forte proportion.

Utérus isolé de Cobaye vierge.

L'action de l'acétylcholine sur le muscle utérin vue par FÜHNER [130] a été adoptée comme méthode de titrage biologique par WEBSTER [325] utilisant la corne utérine isolée de Cobaye ; mais FELDBERG [113] a attiré l'attention sur le manque de spécificité de ce réactif sur lequel l'histamine est active.

Muscle gastrocnémien énnervé de Chat.

Les muscles squelettiques deviennent très sensibles à l'acétylcholine lorsqu'on a, par section préalable, supprimé leur innervation motrice. Partant de cette donnée de FRANCK [125] (1920), FRANCK NOTHMANX et HIRSCHKAUFMANX [126], ont indiqué une méthode de dosage de petites quantités d'acétylcholine par injection artérielle de l'extrait à essayer, huit jours après la section préalable du sciatique, après fixation du gastrocnémien à un myographe isométrique.

Cette méthode d'une assez grande complication n'est guère usitée. Deux autres techniques, beaucoup plus simples et plus pratiques, utilisant aussi des préparations musculaires, se partagent la faveur des expérimentateurs : le muscle droit de l'abdomen de Grenouille, et surtout le muscle dorsal antérieur de la Sangsue.

Muscle rectus abdominis de Grenouille.

C'est à CHANG et GADDUM (1933) [69] qu'on doit l'application pratique du fait signalé par RIESSER [288], montrant l'effet contracturant de l'acétylcholine sur ce muscle isolé. L'utilisation de l'ésérine, en augmentant à la fois la sensibilité et la spécificité, donna entre leurs mains, une méthode pratique. La préparation consiste à prélever le muscle qu'on met sous légère tension du levier myographique, après repos dans une cuve contenant du Ringer. On sensibilise par action d'une solution de Ringer ésérinée, puis on fait agir l'extrait à essayer et les étalons d'acétylcholine, pendant un temps rigoureusement égal. L'amplitude des contractions est enregistrée.

D'après CHANG et GADDUM [69], cette technique donne des résultats très constants, les réponses du muscle restant très comparables. Sa spécificité est bonne ; la choline est de 1.000 à 10.000 fois moins active, l'ion K^+ , à une certaine concentration, provoque une légère action contracturante, tandis que Ca^{++} , l'histamine, l'adénosine, et les substances P et R extraites par EULER et GADDUM [111] de certains organes et contractant l'intestin isolé, inhibant le cœur, n'agissent en rien sur cette préparation. Cependant, sa sensibilité est relativement faible, elle ne permet guère de déceler l'acétylcholine à une concentration moindre de 1.10^{-7} et encore *Rana temporaria* s'avère moins sensible que *Rana esculenta* habituellement employée.

Muscle dorsal de Sangsue.

L'avantage de sensibilité, de spécificité, et de commodité paraît trouver son maximum dans l'emploi actuellement généralisé du muscle dorsal de Sangsue.

FÜHNER [132], dès 1918, en avait déjà vu l'extraordinaire sensibilité, mais ce n'est que bien plus tard que MINZ [255] (1932) a compris toute la portée de cette propriété et en a fait la base d'une méthode excellente de titrage biologique de l'acétylcholine.

Nous donnerons ici seulement, les grandes lignes de cette technique, sans nous appesantir sur des détails, sur lesquels d'ailleurs nous reviendrons lors de l'exposé des techniques de nos recherches personnelles dans la deuxième partie de ce travail.

Une Sangsue étant fixée sur la face dorsale, on lui sectionne les extrémités antérieure et postérieure, et par deux incisions latérales le long des lignes jaunes, on libère soigneusement le muscle dorsal de toute connexion viscérale et ganglionnaire. La partie antérieure plus sensible (KAHLSON et UYNAS [210]) est prélevée et après 1 à 2 heures de séjour dans le RINGER (1) est montée sur un myographe. Après action de l'ésérine (Ringer éseriné à 1/200.000) pendant 20 à 30' on peut pratiquer les essais. Les contractions amplifiées et inscrites sur un tambour enregistreur tournant lentement sont comparées avec celles que donnent les solutions-étalons.

(1) Pour les formules de solution de Ringer à employer, voir 2^e partie, chapitre I.

La *sensibilité* de cette méthode est vraiment extraordinaire : le muscle de Sangsue ésériné peut répondre par une contraction appréciable à une concentration de 1.10^{-9} et même 1.10^{-10} d'acétylcholine, d'après MINZ. Elle est cependant sujette à d'assez grandes variations selon les expériences, et surtout selon la concentration des solutions en certains sels.

Au point de vue de sa *spécificité*, de nombreux auteurs l'ont étudiée (FÜHNER [132], TESCHENDORFF [305], MINZ [255], FONTAINE [123], DODEL et DASTUGUE [96]). TESCHENDORFF qui fit une étude systématique de l'action des sels minéraux sur cette préparation montra que NO_3^- , I^- , SCN^- en augmentent le tonus, de même que l'insuffisance de Na^+ , l'excès de K^+ , Ba^{++} et NH_4^+ , tandis que Mg^{++} l'abaisse. VERTIAIREN [310] a signalé l'action sensibilisante de l'ésérine vis-à-vis de Ba^{++} . CHANG et GADDUM [69] indiquent seulement que l'ion K^+ provoque un certain relâchement du muscle (alors qu'il contracte le muscle droit de Grenouille) en même temps qu'un phénomène de désensibilisation se produit. L'ion Ca^{++} est pratiquement sans action.

Mais ces modifications salines qui influent sur le tonus et la sensibilité doivent être très intenses pour troubler le dosage lorsqu'on opère sur un extrait suffisamment dilué, alors qu'elles sont un inconvénient certain pour les essais d'extraits concentrés.

L'alcool éthylique provoque le relâchement du muscle et en altère très vite la sensibilité (TESCHENDORFF [305]). L'histamine, la peptone sont sans action et il faut une forte concentration de choline ou de neurine (1/10.000) pour provoquer une contraction (MINZ [255]). D'après

le même auteur, l'atropine agirait faiblement à la concentration de 1/2.000 et l'adrénaline, la tyramine, sans action sur le muscle énérvé auraient un léger effet en présence des ganglions.

Th. FONTAINE [123], dans une étude détaillée de l'action pharmacologique de nombreux produits organiques, note l'influence de certains poisons musculaires (spartéine, vératrine, nicotine, triméthylamine, iodure de triméthylammonium, iodométhylate d'urotropine, cyanure d'éthyle, aldéhyde formique), qui provoquent à dose importante des contractions brusques, d'emblée maximales et souvent revêtant un rythme irrégulier. Activité rythmique de même avec la quinine, la quinidine (DODEL et DASTUGUE [96]), le phényl-barbiturate de quinine (BUSQUET [58]). Les anesthésiques (DASTUGUE [91]) abaissent le tonus du muscle, de même que l'héroïne et la morphine. Par contre, les acides aminés, de même que la lécithine, l'urée, l'histamine, le curare, la guanidine, la créatine sont dépourvus d'action. A propos de cette dernière, signalons que EMMELIN et KAHLSON [107] auraient vu l'activité de la créatinine ou en tous cas son influence sensibilisatrice.

Malgré les réserves apportées par ces constatations, (les corps ci-dessus indiqués n'agissent qu'à d'assez fortes concentrations), on peut considérer le muscle de Sangsue comme spécifique de l'acétylcholine ; mais il est nécessaire de satisfaire aux conditions suivantes, énoncées par CHANG et GADDUM [69] pour pouvoir affirmer qu'on se trouve en présence de la « substance équivalente à l'acétylcholine » :

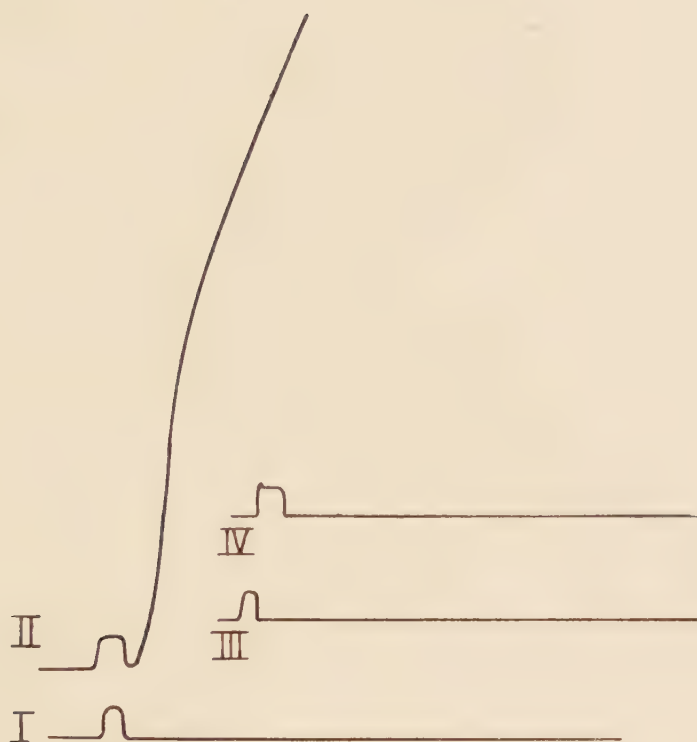


FIG. 2. — Action d'une solution de chlorure d'Acétylcholine $0,5 \cdot 10^{-7}$ sur le muscle dorsal antérieur de Sangsue.

I Muscle non ésériné.

II Muscle ésériné.

III. Sol. d'A.C. même concentration traitée par le sérum 5 %, 20', 37°.

IV. Sol. d'A.C. même concentration, dilution d'une sol. plus concentrée préalablement traitée par NaOH, N, pendant 10' à froid.

1) L'effet doit être augmenté dans de grandes proportions par l'ésérine.

2) L'activité doit disparaître rapidement lorsqu'on ajoute du sérum à l'extrait neutralisé.

3) De même, le passage en milieu fortement alcalin, pendant environ 10 minutes (volume égal de NaOH, 2N) à la température ordinaire doit en détruire l'effet.

On en voit un exemple dans la figure ci-contre (fig. 2).

Le sérum, en effet, riche en cholinestérase détruit l'activité de l'acétylcholine qui est transformée en choline, alors qu'il ne modifie en rien celle de la choline. L'hydrolyse alcaline produit un effet semblable.

Ces faits permettent de distinguer l'acétylcholine de la choline. De plus, cette dernière, qui est de 1.000 à 10.000 fois moins active, ne voit aucunement son effet s'accroître par l'ésérine. On l'explique en partie par l'action inhibitrice de l'ésérine sur la cholinestérase normale du muscle ; elle augmente ainsi la réponse du muscle à l'acétylcholine qui n'étant plus hydrolysée, atteint à une concentration plus forte, les cellules sensibles (KAHANE et J. LÉVY [200]). A ce propos, remarquons que le mécanisme d'inhibition cholinestérasique ne paraît pas tout dans le phénomène de sensibilisation du muscle de Sangsue par l'ésérine. KAHANE et J. LÉVY [201] ont montré que le parallélisme : potentialisation par l'ésérine — destruction par le sérum, est loin d'être absolu pour les divers esters de la choline. De plus, certains inhibiteurs de l'estérase *in vitro* (ergotamine, fluorures, atoxyl, prostigmine, muscarine, histamine, éphédrine, génésérine, et choline elle-même, etc) ont une action sensibilisante très faible (BAYER et WENSE [26], KAHLSON et UYNAS

[210], KAHANE et J. LÉVY [199]. D'ailleurs, l'ésérine sensibilise le muscle à certaines substances (baryum, muscarine, nicotine, neurine, bétaine) qui ne sont nullement touchées par l'estérase. En plus de l'action anticholinestérasique, il faut donc admettre que l'ésérine agit par hypersensibilisation cellulaire, vis-à-vis de l'acétylcholine (E. CORTEGGIANI [77]) par un autre mécanisme encore mystérieux.

On peut dans une certaine mesure, en utilisant parallèlement l'essai sur d'autres réactifs pharmacodynamiques, distinguer l'acétylcholine d'autres esters de la choline. En particulier, l'effet de la carbaminoylcholine n'est pas modifié par l'ésérine. Cet ester n'est pas hydrolysé par le sérum (KAHANE et J. LÉVY [200 bis]). Ces auteurs ont montré cependant que pour d'autres esters, par exemple, l'acétyl- β méthylcholine, l'animal n'est pas sensibilisé alors que le sérum la détruit *in vitro*, beaucoup moins vite il est vrai que l'acétylcholine (SIMONART [293]), si bien que chez l'animal non ésériné son action est très supérieure à celle de l'acétylcholine VILLARET, JUSTIN-BESANÇON, CACHERA et SAID [314] l'ont trouvée douée d'une action hypotensive bien plus marquée que celle dernière par voie sous cutanée. Il en serait de même de la carbaminoylcholine selon KREITMAIR [216], NÖLL [270], VELTEN [309]. Sur le muscle de Sangsue ésériné, tous les esters de la choline ont une activité plus faible que l'acétylcholine : presque égale pour la butyrylcholine, elle est réduite à 45 % pour l'ester propionique, à 16 % pour le dérivé pyruvique, et à moins de 1 % pour l'ester valérique (CHANG et GADDUM [69]).

CHAPITRE II

Répartition de l'acétylcholine dans le monde animal

A la lumière des travaux très nombreux qui, durant ces 10 dernières années, se sont attachés à cette question, on peut dire que l'acétylcholine paraît être un constituant normal des tissus animaux. On la rencontre presque partout ; mais il ne s'ensuit pas que sa banalité lui enlève son intérêt primordial. L'étude de sa répartition quantitative, de ses états physico-chimiques dans les organismes s'est révélée jusqu'à présent des plus fécondes.

CHEZ LES VERTÉBRÉS

Si l'existence d'une « substance analogue à l'acétylcholine » semble prouvée par la voie biologique, pour la plupart des organes de Vertébrés, l'identification chimique absolue n'a été réalisée que très rarement avec certitude. Rappelons les travaux si contro-

versés de l'école de KAPFHAMMER [41-42-211], les résultats de DALE et DUDLEY [85]. E. et El. STEDMAN [300] l'ont récemment isolée à partir du cerveau de Bœuf.

A cause de la diversité des méthodes employées, n'isolant pas toutes le principe actif par des techniques éprouvées, l'exposé pur et simple des données numériques accumulées par les auteurs formerait un ensemble disparate, bien peu édifiant, qui risquerait de jeter un discrédit injustifié sur une partie des plus intéressantes de la chimie physiologique. Il importe avant tout de préciser la valeur de certains chiffres qui, au lieu d'être simplement erronés, ouvrent au contraire des horizons nouveaux sur les divers états physico-chimiques ou les liaisons complexes de l'acétylcholine dans les organes.

Sang.

L'exemple le plus instructif, à ce point de vue, est bien celui du sang. KAPFHAMMER et BISCHOFF (1930) [211] puis, BISCHOFF, GRAB et KAPFHAMMER [41] qui, les premiers tentaient de décèler et de doser chimiquement l'acétylcholine dans le sang, rapportèrent les chiffres de 20 γ ; 14 à 39 γ d'acétylcholine par gramme (1) dans le sang de Bœuf, alors que d'autres auteurs expérimentant à leur suite, obtinrent des résultats négatifs (GOLLWITZER-MEIER [151], WREDE et KEIL [328]

(1) Tous les chiffres donnés le seront, à moins d'indication contraire, en γ de chlorure d'acétylcholine par gramme de tissu frais.

LOACH [231] ; KAHLSON et ROEMER [209]). DUDLEY [101] utilisant, dans toutes les conditions requises, la méthode de KAPFFHAMMER ne put isoler d'acétylcholine dans le sang, à son retour en Angleterre, tandis que ETTINGER et HALL [110] réussissaient à en déceler des traces, et VOGELFANGER [323] des quantités plus considérables. Cependant, par la méthode biologique CHANG et GADDUM [69] n'en trouvèrent que : $0 \gamma 06$ à $0 \gamma 08$ chez le Bœuf ; $0 \gamma 05$ à $0 \gamma 06$ chez le Cheval et chez le Lapin ; FELDBERG et ROSENFELD [116] en montraient l'existence dans le sang porte du Chien éseriné après excitation du X ; GOLLWITZER-MEIER [151] indiquait une libération hémolytique d'acétylcholine. D'ailleurs, les essais de FRANEL [127] de FLEISCH, SIBUL et KEILIN [122], BLUM [44], recueillant le sang directement en milieu éseriné n'accusèrent qu'exceptionnellement un effet acétylcholinique sur le muscle de Sangsue chez l'animal normal, après travail musculaire prolongé, mais seulement parfois après la mort ou lorsque le déséquilibre circulatoire était très intense. Signalons qu'une substance vasodilatatrice, dont l'effet n'est pas bloqué par l'atropine, au dire de FLEISCH [121], existe dans les hématies ; elle est facilement détruite par le sérum, mais ce ne paraît être ni l'histamine, ni la choline ou ses esters. STUDER et WEGER [303] qui ont tenté de l'isoler estiment qu'elle se rapproche de l'acide adényl-pyrophosphorique.

Récemment (1937) KAHANE et J. LÉVY [203] après une étude approfondie des conditions d'extraction, réussirent à doser des quantités plus considérables d'acétylcholine dans le sang en le recevant immédia-

tement dans l'eau bouillante et en titrant par la voie biologique : 0 γ 1 à 20 γ chez l'homme ; 0 γ 1 à 0 γ 6 chez le Mouton, 0 γ 1 à 1 γ 4 chez le Porc ; 0 γ 2 chez le Veau ; 0 γ 15 à 8 γ chez le Bœuf ; 0 γ 16 à 6 γ chez le Cheval ; 0 γ 1 à 8 γ chez le Chien ; 0 γ 1 à 6 γ 4 chez le Cobaye ; 0 γ 4 à 1 γ 6 chez le Rat. Ces auteurs ne purent toutefois jamais isoler chimiquement l'acétylcholine du sang ; les divergences observées selon les conditions d'extraction ainsi que l'écart important trouvé par eux entre les chiffres extrêmes, leur font admettre une libération d'acétylcholine à partir d'un complexe où elle était dissimulée, complexe dont la dislocation apparaît comme irrégulière dans des conditions identiques d'expérience, et au sujet duquel on n'a pour l'instant aucune précision. A son sujet pourtant, BROUN et SCHEINER [49] ont vu le complexe non ultra-filtrable libérer de l'acétylcholine par alcalinisation.

Divers organes.

Mis à part, les résultats chimiques de BISCHOFF, GRAB et KAPFHAMMER [42] qui sont très élevés et comportent les causes d'erreurs que l'on sait (erreurs probablement dues à la carnitine (STRACK, WORDEHOFF, NEUBAUR et GEISSENDÖRFER [302 bis] les chiffres donnés sont assez concordants ; nous en ferons ici un exposé assez complet.

Les chiffres seront donnés en γ d'acétylcholine par gramme de tissu frais. GAUTRELET et E. CORTEGGIANI [77] ont démontré l'existence dans de nombreux tissus (système nerveux en particulier) d'acétylcholine mas-

quée sous forme de complexe et libérable par chauffage de l'extrait en milieu salin à 70° pendant 3'. Les nombreuses déterminations empruntées à la thèse récente de E. CORTEGGIANI [77] comportent deux chiffres qui ne sont pas les chiffres extrêmes des dosages, mais dont le premier se rapporte à l'acétylcholine primitivement libre, et l'autre à l'acétylcholine dite totale (AC libre + AC libérée par la chaleur).

Foie.

Chat : 0 γ 02 (PLATTNER) ; 0 γ 09 (PLATTNER et TSUDZIMURA).

Chien : 0 (STRACK, NEUBAUER et GEISSENDÖRFER) ; 0 γ 11 (CHANG et GADDUM).

Bœuf : 0 (STRACK, NEUBAUER et GEISSENDÖRFER) ; 84 γ (BISCHOFF, GRAB et KAPFHAMMER).

Cobaye : 0 γ 3 (GAUTRELET, CORTEGGIANI, KASWIN et MENTZER).

Ces derniers auteurs ont mis en évidence une libération d'acétylcholine après broyage qu'ils rapportent à une action diastasique et qui est maxima après deux heures.

Pancréas.

Chat : 1 γ 2 (PLATTNER et TSUDZIMURA) ; 2 γ (CORTEGGIANI).

Cheval : 0 γ 6 ; Chien : 0 γ 13 — 0 γ 22 (CHANG et GADDUM).

Bœuf : 152 γ (BISCHOFF, GRAB et KAPFHAMMER).

Chien : 0 γ 15 ; Cobaye : 0 γ 2 (CORTEGGIANI).

Hérisson : 0 γ 4 — 1 γ 5 (CORTEGGIANI).

Pigeon : 1 γ 4 ; *Raia clavata* : 1 γ 8 (CORTEGGIANI).

Rate.

Cheval : 5-30 γ (DALE et DUDLEY) ; 4-30 γ (CHANG et GADDUM).

Bœuf : 38 γ (BISCHOFF, GRAB et KAPFHAMMER) ; 3-18 γ (KAHLSON) ; 1-4 γ (GOLLWITZER-MEIER et KRÜGER).

Chien : <0 γ 1 (CHANG et GADDUM) ; 0 (GOLLWITZER-MEIER et KRÜGER).

Chat : 0 γ 2 — 0 γ 4 (PLATTNER et TSUDZIMURA, KAHLSON, GOLLWITZER-MEIER et KRÜGER).

Lapin, Porc : 0 (KAHLSON).

Ce contraste entre la richesse en A. C. de la rate de Cheval et de Bœuf et la pauvreté de celle de Chien, Chat et Lapin, quoique difficilement explicable, paraît avoir été confirmé par la majorité des auteurs.

Estomac.

Chien : 0 γ 7 (CHANG et GADDUM) ; 0 γ 3 — 0 γ 7 (CORTEGGIANI).

Chat : 1 γ 2 — 1 γ 3 (PLATTNER et TSUDZIMURA).

Cobaye : 0 γ 5 — 1 γ 5 ; Hérisson : 1 γ — 2 γ 5 ; Grenouille : 0 γ 2 — 0 γ 7 (CORTEGGIANI).

Tortue : 0 γ 2 — 1 γ ; *Raia clarata* et *Scyllium can.* : 0 γ 5 — 1 γ (CORTEGGIANI)

Esophage.

Chat : 0 γ 4 (CHANG et GADDUM).

Intestin.

Bœuf : 45 γ (BISCHOFF, GRAB et KAPFHAMMER).

Chien : 1 γ 7 — 2 γ 6 (CHANG et GADDUM) ; 1 γ 5 — 2 γ 5 (CORTEGGIANI).

Chat : 1 γ 4 — 1 γ 5 (PLATTNER et TSUDZIMURA) ; 1 γ — 3 γ (CORTEGGIANI).

Cobaye : 0 γ 5 — 6 γ (KAHLSON) ; 1 γ 5 — 4 γ (CORTEGGIANI).

Lapin : 2 γ 8 — 4 γ (CHANG et GADDUM) ; 0 γ 5 — 6 γ (KAHLSON) ; 0 γ 8 — 2 γ (CORTEGGIANI).

Hérisson : 2 γ — 10 γ ; Grenouille : 0 γ 1 ; Léopard : 0 γ 1 ; Tortue : 1 γ — 3 γ (CORTEGGIANI).

Ces données correspondent à l'intestin grêle, mais le gros intestin a une teneur semblable en A.C. (PLATTNER et TSUDZIMURA, CHANG et GADDUM). De plus, E. CORTEGGIANI a remarqué que dans l'intestin du jeune Chien et du jeune Chat (12 jours), on trouve environ 2 fois plus d'A.C. que chez l'adulte.

Mésentère.

Chien : <0 γ 1 (CHANG et GADDUM).

Rein.

Bœuf : 68-82 γ (BISCHOFF, GRAB et KAPFHAMMER) ; 0 γ 06 (PLATTNER et TSUDZIMURA).

Chien : 0 (CHANG et GADDUM).

Surrénales.

Bœuf : (médul.) 215 γ (BISCHOFF, GRAB et KAPFHAMMER) ; 0 γ 72 (médul.) 0 γ 2 (cort.) (FELDBERG et SCHILD).

Cheval : 0 γ 4 — 0 γ 6 (CHANG et GADDUM) ; 0 γ 45 — 0 γ 53 (médul.), 0 γ 1 — 0 γ 2 (cort.) (FELDBERG et SCHILD).

Chat : 1 γ 2 — 1 γ 4 (PLATTNER et TSUDZIMURA) ; 0 γ 3 — 0 γ 7 (PLATTNER) ; 0 γ 8 (CORTEGGIANI).

Chien : 0 γ 33 (PLATTNER) ; 0 γ 7 (CORTEGGIANI) ; Cobaye : 2 γ (CORTEGGIANI).

Vessie.

Chien : 1 γ 2 (CHANG et GADDUM) ; Chat : 2 γ 3 — 2 γ 8 (PLATTNER et TSUDZIMURA).

Utérus.

Vache (gravide) : 0 (BISCHOFF, GRAB et KAPFHAMMER).

Lapine : 0 γ 4 (CHANG et GADDUM) ; Chatte : 0 γ 3 — 0 γ 9 (PLATTNER et TSUDZIMURA).

Vagin.

Chienne : 0 γ 3 (CHANG et GADDUM).

Placenta.

Femme : 6 γ — 87 γ (BISCHOFF, GRAB et KAPFHAMMER) ; 74 γ — 459 γ (HAUPSTEIN) ; 15 γ — 135 γ (CHANG et WONG).

Vache : 71 γ — 100 γ ; 38 γ — 76 γ (BISCHOFF, GRAB et KAPFHAMMER).

Lapine : 0 (CHANG et GADDUM).

Fœtus.

Lapin : 0 γ 45 (CHANG et GADDUM).

Testicule.

Chien : <0 γ 1 (CHANG et GADDUM) ; Chat : 0 γ 3 (PLATTNER et TSUDZIMURA).

Poumon.

Bœuf : 101 γ (BISCHOFF, GRAB et KAPFHAMMER) ; Chat : 0 γ 5 — 0 γ 6 (PLATTNER et TSUDZIMURA).

Chien : 0 γ 13 (CHANG et GADDUM).

Trachée.

Chien : 0 γ 2 (CHANG et GADDUM).

Glandes sous-maxillaires.

Chien : 1 γ — 3 γ 3 (CHANG et GADDUM); 1 γ — 3 γ (CORTEGGIANI).

Chat : 2 γ 8 — 3 γ (PLATTNER et TSUDZIMURA); 0 γ 3 — 0 γ 7 (CORTEGGIANI).

Glande parotide.

Chat : 0 γ 9 (CHANG et GADDUM; PLATTNER et TSUDZIMURA).

Salive.

Chat : + (non dosé) (LARSON).

Lait.

Vache : 14 γ — 38 γ (BISCHOFF, GRAB et KAPFHAMMER).

Chatte : 0 (PLATTNER et TSUDZIMURA).

Thymus.

Bœuf : 109 γ — 112 γ (BISCHOFF, GRAB et KAPFHAMMER).

Thyroïde.

Chat : 0 γ 25 (PLATTNER et TSUDZIMURA).

Hypophyse.

Chat : 0 γ 8 — 2 γ (PLATTNER).

Cœur.

Bœuf : 23 γ — 32 γ (BISCHOFF, GRAB et KAPFHAMMER).

Chien : oreillette : 0 γ 9 — 1 γ 9, ventricule : 0 γ 1 — 0 γ 35 (CHANG et GADDUM); 0 γ 2 (CORTEGGIANI).

Lapin : oreillette : 4 γ , ventricule : 0 γ 13 (ENGELHARDT).

Chat : 0 γ 6 (PLATTNER et TSUDZIMURA); 0 γ 3 (CORTEGGIANI).

Cobaye : 0 γ 5; Hérisson : 0 γ 4 (CORTEGGIANI).

Muscles squelettiques.

Bœuf : 194 γ (BISCHOFF, GRAB et KAPFHAMMER).

Cheval, Lapin, Grenouille : 0 γ 06 — 0 γ 08 (CHANG et GADDUM).

Diaphragme.

Chien : $<0 \gamma 1$ (CHANG et GADDUM).

Peau.

Lapin : $0 \gamma 1$ (CHANG et GADDUM).

Œil.

Lapin : $0 \gamma 6$ (CHANG et GADDUM).

Glandes lacrymales.

Chien : $1 \gamma 35$ (PLATTNER) ; Chat : $3 \gamma 4 - 4 \gamma$ (PLATTNER et TSUDZIMURA).

SYSTÈME NERVEUX.

Cerveau.

Chien : $0 \gamma 4$ (CHANG et GADDUM) ; $1 \gamma 5 - 3 \gamma 8$ (KWIATKOWSKI) ;
 $0 \gamma 2 - 0 \gamma 5$ (CORTEGGIANI).

Lapin : $0 \gamma 8 - 2 \gamma$ (CORTEGGIANI).

Chat : $0 \gamma 5 - 4 \gamma$ (DIKSHIT) ; $0 \gamma 4 - 2 \gamma$ (KWIATKOWSKI) ;
 $1 \gamma 7 - 4 \gamma 2$ (PLATTNER) ; $0 \gamma 7 - 1 \gamma 3$ (PLATTNER et TSUDZIMURA) ;
 $0 \gamma 8 - 1 \gamma 5$ (CORTEGGIANI).

Bœuf : $0 \gamma 2 - 0 \gamma 4$ (CORTEGGIANI).

Mouton : $0 \gamma 35 - 0 \gamma 8$ (CORTEGGIANI).

Cobaye : $0 \gamma 6 - 2 \gamma 3$ (KWIATKOWSKI) ; $1 \gamma 1 - 4 \gamma$ (CORTEGGIANI).

Rat : $0 \gamma 6 - 1 \gamma 9$; Hérisson : $0 \gamma 7 - 2 \gamma 7$; Pigeon : $1 \gamma 5 - 3 \gamma$.

Grenouille : $1 \gamma 5 - 5 \gamma$; Lézard : $2 \gamma 4 - 5 \gamma 6$; *Raia clav.* :
 $2 \gamma - 4 \gamma 5$; *Scillium can.* : $2 \gamma 5 - 5 \gamma$; *Labrus berg.* : $1 \gamma 5 - 4 \gamma$ (CORTEGGIANI).

Les diverses parties du système nerveur central ont fait l'objet d'études plus détaillées de BARSOUM [24].

	Homme	Chien	Bœuf
<i>Pédoncules cérébraux.</i>	0 γ 5	1 γ 1	
<i>Thalamus</i>	0 γ 85	2 γ 2	0 γ 75
<i>Corps strié</i>	0 γ 5	1 γ 1	0 γ 5
<i>Hémisphères :</i>			
Subst. grise	0 γ 75	0 γ 9	0 γ 85
Subst. blanche	0 γ 27	0 γ 55	0 γ 5
<i>Cervelet</i>	0 γ 10	0 γ 4	0 γ 2-0 γ 4
<i>Protubérance</i>	0 γ 2	0 γ 5	0 γ 25
<i>Bulbe</i>	0 γ 16	0 γ 5	0 γ 4
<i>Moelle</i>	0 γ 45	0 γ 75	(BARSOU)
	Chat	Cobaye	Rat
	0 γ 2 — 0 γ 7	1 γ 5 — 2 γ 2	0 γ 8 — 1 γ 5 (CORTEGGIANI)

Liquide céphalo-rachidien.

Chat: 0 γ 3 (PLATTNER et TSUDZIMURA) ; + (non dosé) (DIKSHIT, FELDBERG et SCHRIEVER).

Nerfs.

Vago-sympathique : Chien : 8 γ (BINET et MINZ) ; 1 γ 6 — 4 γ KWIATKOWSKI) ; 4 γ 5 — 5 γ 6 (BARSOU).

Splanchnique : Chien : 8 γ 5 — 10 γ 5 (BARSOU).

Chaîne sympathique : Cheval : 1 γ 3 — 3 γ 9 (CHANG et GADDUM).

Sciatique : Chien : 1 γ 7 — 2 γ 5 (BARSOU) ; 0 γ 2 — 3 γ 1 KWIATKOWSKI) + (non dosé) (BINET et MINZ).

Chat : 0 γ 8 — 3 γ 6 (KWIATKOWSKI).

Chiasma optique : Chien : 1 γ (BARSOU).

Nerf hypogastrique : Chien : 4 γ (BARSOU).

Plexus brachial : Chien : 2 γ — 2 γ 3 (BARSOU).

A signaler que récemment O. LÆWI et HELLAUER [237] n'ont trouvé d'A.C. que dans les nerfs efférents, mais non dans les nerfs sensitifs et les racines postérieures.

CHEZ LES INVERTÉBRÉS

Si l'on excepte les recherches de J. GAUTRELET [139] (1909-1910) d'ACKERMANN et KUTSCHER [3] (1922) qui tentaient de déceler la choline chez les Vers, Mollusques, Cœlentérés, très récents sont les travaux portant sur l'existence et la répartition des esters de la choline chez les Invertébrés. BACQ [12-13] (1935) se proposant de rechercher si les processus de médiation cholinergique s'étendent aux Invertébrés, ouvrit la voie dans ce domaine. Il réussit à démontrer la présence d'une « substance équivalente à l'acétylcholine » chez les Mollusques, les Vers et les Echinodermes, en même temps que de cholinestérase. Isolant avec MAZZA [21] des ganglions nerveux de Poulpe (*Octopus vulgaris*) un chloroaurate présentant tous les caractères morphologiques et analytiques du chloroaurate d'acétylcholine, il en apporta la preuve chimique péremptoire. Cependant, chez les Ascidies, les Cœlentérés et les Porifères, ses essais biologiques restaient négatifs. Il en était de même chez les Crustacés qu'il trouva dépourvus de cholinestérase et insensibles à l'acétylcholine. Depuis [16], il précisa, modifia et compléta ses premières données, notamment en ce qui concerne les Crustacés. L'école de GAUTRELET, Mlle CORTEGGIANI [77] en particulier, apporta d'intéressants documents à cette étude. Nous-même, avec A. JULLIEN, lui avons donné notre contribution personnelle que nous rapporterons plus loin avec détails (voir 2^e partie).

Voici quelques données numériques sur l'acétylcholine chez les Invertébrés (en γ d'Acétylcholine par gramme de tissu frais).

MOLLUSQUES

CÉPHALOPODES.

Octopus vulgaris : Ganglions cérébroïdes : 77 γ (BACQ) ; 25 γ -90 γ (CORTEGGIANI). — Bras écorchés : 3 γ (BACQ). — Estomac et œsophage : 1 γ 4 (BACQ). — Tube digestif : 0 — 0 γ 3 (CORTEGGIANI). — Glaude salivaire postérieure : 1 γ 3 (BACQ) ; 0 γ 5 (CORTEGGIANI). — Glandes génitales mâles : 0 (BACQ), (CORTEGGIANI). — Ovaire : 0 γ 2 ; peau : 0 γ 15 — 0 γ 2 ; rein : 0 γ 36 (BACQ). — Muscle du manteau : 0 γ 1 — 0 γ 7 (BACQ). — Foie : 0 (CORTEGGIANI) ; <0 γ 2 (BACQ). — Cœurs branchiaux, ventricule médian, cæcum : <0 γ 2 (BACQ). — Sang : 0 (BACQ).

Sepia officinalis : Ganglions cérébraux : 10 γ — 80 γ (CORTEGGIANI). — Tube digestif : 0 γ 5 — 0 γ 8 (CORTEGGIANI).

GASTÉROPODES.

Aplysia depilans : Ganglions périœsophagiens : 2 γ — 3 γ ; pied : 0 γ 35 ; estomac et œsophage : 0 γ 6 ; foie : <0 γ 2 ; sang : <0 γ 01 (BACQ).

Helix pomatia : Ganglions cérébroïdes : 4 γ — 12 γ ; hétopancréas : 0 (CORTEGGIANI).

Halotis tuberculata : Ganglions cérébroïdes : 5 γ — 20 γ ; tube digestif : 4 γ — 7 γ (CORTEGGIANI).

LAMELLIBRANCHES.

Pectunculus violascens : corps entier : 0 γ 65 ; sang : 0 (BACQ).

Venus verrucosa, *Pecten Jacobeus* : animal entier privé de ses muscles : 0 (CORTEGGIANI).

VERS

Halla parthenopea : corps entier : 0 γ 8 (BACQ).

Spirographis Spallanzanii : corps entier : 0 γ 5 — 0 γ 7 (BACQ).

Arenicola marina : animal entier privé d'intestin : 0 γ 5 (CORTEGGIANI).

Perinereis cultrifera : animal entier privé d'intestin : 0 γ 3 (CORTEGGIANI).

GÉPHYRIENS

Sipunculus nudus : animal entier : 0 γ 8 — 0 γ 9 (BACQ) ; 4 γ — 5 γ (CORTEGGIANI) ; muscle : 0 γ 7 ; sang : 0 (BACQ).

ECHINODERMES

Holothuria tubulosa : muscle longitudinal : 1 γ 5 — 1 γ 7 (BACQ) ; intestin : 0 γ 4 (BACQ) ; tube digestif : 0 γ 4 — 0 γ 8 (CORTEGGIANI).

Asterias glacialis : tube digestif : 6 γ — 12 γ (CORTEGGIANI).

Paracentrotus lividus : glandes génitales mâles : 0, femelles : < 0 γ 08 (CORTEGGIANI).

CRUSTACÉS

Maia squinado : organes et muscles : < 0 γ 15 ; sang : 0 (BACQ) ; ganglions nerveux : 4 γ — 8 γ ; 4 γ — 12 γ (CORTEGGIANI).

Peneus caramote : corps entier : 0 γ 18 (BACQ).

Palinurus vulgaris : muscles abdominaux : < 0 γ 1 (BACQ).

Lepas anatifera : corps entier avec pédoncules : 0 γ 15 (BACQ).

Cancer pagurus : muscles, totalité des organes : 0 (CORTEGGIANI) ; ganglions nerveux : 15 γ à 20 γ (CORTEGGIANI).

Astacus fluviatilis : système nerveux : 30 γ à 75 γ (CORTEGGIANI).

ASCIDIES

Ciona intestinalis, *Phallusia mamillata* : corps entier, muscles, sang : 0 (BACQ).

CÉLÉNTÈRES

Adamsia palliata, *Adamsia rondeletii*, *Rhizostoma pulmo*, *Alcyonum palmatum* : corps entier : 0 (BACQ).

Actinia equina : corps entier : 0 (CORTEGGIANI).

PORIFÈRES

Leuconia asperta, *Siphonocula crassa* : animal entier : 0
(BACQ).

PROTOZOAIRE

Paramecium : animal entier : 0 γ 27 — 1 γ 08 (BAYER et
WENSE).

CHAPITRE III

La cholinestérase

En regard de la répartition de l'acétylcholine dans l'organisme vivant, s'impose l'étude d'un ferment dont la propriété essentielle est d'hydrolyser cet ester et par suite, de l'inactiver. Pour admettre l'existence d'un mécanisme cholinergique dans un organe, il faut en effet déceler à côté de l'acétylcholine l'activité fermentaire cholinestérasique ; cette dernière « évite la diffusion, à l'entour, des effets de l'excitation des nerfs » (BACQ [16]).

DALE [82] le premier en 1914 suggéra l'intervention d'une action fermentaire pour expliquer la destruction de l'acétylcholine dans les tissus. *In vivo*, HUNT [171] avait remarqué la disparition rapide de l'acétylcholine injectée dans le torrent circulatoire. LOEWI et NAVRATIL [238], ENGELHARDT et LOEWI [109 bis] démontrèrent plus tard la réalité de ce mécanisme enzymatique : *in*

vitro, ils virent les tissus de Grenouille (cœur), le sérum inactiver très vite l'acétylcholine ; le chauffage à 56°, fait préalablement, l'irradiation ultra-violette empêchaient cette action, de même que l'addition d'ésérine ou d'ergotamine. Ces auteurs expliquèrent ainsi, par inhibition fermentaire de la cholinestérase, l'action sensibilisante de l'ésérine vis-à-vis de l'acétylcholine, fait déjà vu par FÜHNER [131] en 1918.

Ces diverses données fondamentales furent complétées par de nombreux auteurs : PLATTNER et HINTER [277], PLATTNER et GALEHR [276], AMMON [6], AMMON et VOSS [8], MATTHES [252], Ed. et El. STEDMAN [295-296], KAHANE et J. LÉVY [199 et suiv.], qui étudièrent l'activité cholinestérasique de divers tissus et découvrirent de nombreux inhibiteurs de ce ferment. BACQ [15-16], GAUTRELET et son Ecole [145-158] étendirent ces recherches aux Invertébrés, tandis que tout récemment NACHIMANSOHN [264 et suiv.], MARNAY [248 et suiv.], démontrèrent l'intensité éleclive de cette action enzymatique dans le système nerveux central et dans les terminaisons nerveuses musculaires.

D'un autre côté, la réaction inverse (re-synthèse de l'acétylcholine par la cholinestérase) était démontrée dans une certaine mesure par ABDERHALDEN et PAFFRATH [1] (1925), puis, par AMMON et KWIATKOWSKI [7] dans la muqueuse de l'intestin grêle chez les animaux supérieurs.

MODES DE DÉTERMINATION DE L'ACTIVITÉ CHOLINESTÉRASIQUE

Plusieurs moyens de « dosage de la cholinestérase » dans les tissus ont été, avec plus ou moins de précision, préconisés par les auteurs. La plupart consistent à mettre en présence d'une solution d'acétylcholine, l'extrait d'une quantité connue de tissu à température fixe et pendant un temps donné ; au bout de ce temps, on détermine par le dosage de la quantité d'acétylcholine restante le pourcentage de produit hydrolysé par un gramme de tissu dans les conditions données. PLATTNER et HINTER [277] mesuraient l'activité d'après le nombre de minutes nécessaires à la destruction de 50 % de l'acétylcholine. HALPERN et CORTEGGIANI [158], utilisant l'arrêt du cœur d'Escargot provoqué par une solution d'acétylcholine, déterminaient l'activité d'un extrait ajouté, par le temps nécessaire à la reprise spontanée des mouvements cardiaques. Mais, à cette méthode peu précise, ils préférèrent bientôt l'emploi du muscle de Sangsue en déterminant le pourcentage d'acétylcholine hydrolysée en un temps donné.

Plus exactes que ces méthodes biologiques, et aussi plus rapides pour les dosages en série, sont les *techniques chimiques* (AMMON et VOSS [8] ; STEDMAN, STEDMAN et EASON [296], QUASTEL [283]). On appliqua d'abord la méthode de titrage continu de WILLSTATTER [326], puis on en vint aux méthodes *manométriques* dont le principe est le suivant : dans un appareil de Warburg,

on met en contact une solution d'acétylcholine avec l'extrait à titrer, en RINGER bicarbonaté ; l'acide acétique provenant de l'hydrolyse de l'acétylcholine dégage CO^2 ; on mesure l'activité fermentaire par la quantité de CO^2 dégagée en fonction du temps. MARNAY et NACHMANSOHN [245 et suiv.] plus récemment, dosaient par manométrie l'A. C. restante après un temps donné. Ils appellent Q.che, le nombre de milligrammes d'A. C. hydrolysés par 100 milligrammes de tissu en 1 heure.

Ces méthodes présentent le grand avantage de permettre d'établir facilement la courbe d'activité cholinestérasiqne d'un tissu en fonction du temps (courbe qui est caractéristique des actions diastasiques), et leur précision compense largement leur inconvénient de nécessiter un appareillage un peu compliqué et coûteux.

A l'aide de telles techniques, on peut étudier d'une part les inhibiteurs de la cholinestérase, d'autre part, la répartition de ce ferment dans les organes.

LES INHIBITEURS DE LA CHOLINESTÉRASE

Influences physiques et physico-chimiques.

Le facteur le plus important à ce point de vue, est le pH du milieu. PLATTNER, GALEHR et KODERA [278] en faisaient déjà mention, et KAHANE [195] y insiste tout particulièrement à juste titre. L'acidité inhibe l'effet de la cholinestérase qui n'agit plus que faiblement à $\text{pH} = 6,2$, et plus du tout au-dessous de $\text{pH} = 4,4$ (KAHANE). On admet qu'elle reste sensiblement cons-

tante entre $\text{pH} = 6,8$ et $7,6$. Au contraire, son activité augmente dans d'énormes proportions au-dessus de $\text{pH} = 8$; ce fait est très compréhensible puisque le ferment catalyse l'hydrolyse de l'acétylcholine qui est spontanément rapide en milieu fortement alcalin.

D'après BERNHEIM et BERNHEIM [33], GLICK [150] son pH optimum d'action se situe à $8,4$.

Comme tous les ferments, la cholinestérase est inhibée par l'irradiation ultra-violette (LOEWI et NAVRATIL [238]). Cette inhibition qui est une véritable destruction de l'édifice fermentaire est irréversible.

Influences chimiques.

De nombreuses substances ont été reconnues inhibitrices de la cholinestérase. Nous nous y sommes déjà arrêté à propos du mécanisme de sensibilisation du muscle de Sangsue. Rappelons seulement les principales : en premier lieu l'ésérine et l'ergotamine (LOEWI et NAVRATIL [239]) ; la pilocarpine qui a, d'après F. et M. BERNHEIM [33], une activité moins marquée que l'ésérine ; le fluorure de Na (MATTHES [252]) qui est un inhibiteur fermentaire général ; la quinine, l'atoxyl (PLATTNER et HINTER [279]) ; l'aldéhyde formique (CORTEGGIANI, GAUTRELET, HALPERN et SERFATY [79]) , l'histamine (BAYER et WENSE [26]) ; la nicotine (MATTHES [252]) ; la muscarine, la prostigmine et même, à dose assez forte, l'atropine (AMMON [6]) ; la génésérine (dont l'action est, à ce point de vue, moins intense que celle de l'ésérine) ; l'antipyrine, l'éphédrine et certains anesthésiques et narcotiques : l'héroïne (DASTUGUE [91]), la

morphine (BERNHEIM [33]) ; enfin l'uréthane (PLATTNER et GALEHR [276]) et un grand nombre de dérivés synthétiques de cette série ; les divers méthyluréthanes : « méthyluréthane α -m-hydroxyphényléthyldiméthylamine, chlorhydrate » ou « miotine », le « para » et surtout le « méta-compound » ou ester-méthyl carbamique du m-hydroxyphényltriméthylammonium, iodure » de STEDMAN [295]. Ce dernier composé serait d'après BACQ et BROWN [17], SCHWEITZER et WRIGHT [291], citant des résultats de STEDMAN, le plus puissant des inhibiteurs de la cholinestérase (10 fois plus actif que l'ésérine).

RÉPARTITION DE LA CHOLINESTÉRASE DANS LES ORGANES

Il ne nous est pas possible, comme nous l'avons fait pour la répartition des esters de la choline, de présenter à ce sujet des données numériques, car les nombreuses investigations des auteurs ont été faites par des méthodes bien différentes et une « unité cholinestérasique » n'a pas encore été définie et adoptée de façon univoque par les chercheurs.

Malgré tout, on a déjà une idée assez nette de la répartition de ce ferment dans les organismes.

En règle générale, la cholinestérase paraît présente dans tous les organes de Vertébrés, et CHANG et GADDUM [69] ont pu d'après les dosages d'activité des divers tissus à ce point de vue, d'après PLATTNER et HINTER [277], dire qu'il existe une relation directe grossière

entre elle et l' « équivalent-acétylcholine » de ces tissus. A tissu riche en esters de la choline, correspond habituellement un pouvoir cholinestérasique intense, mais, s'il n'existe pas d'organe à pouvoir estérasique faible, et à « équivalent-AC » élevé, on trouve certains organes ou certaines humeurs très pauvres en AC, mais très actifs au point de vue cholinestérasique (par exemple le sang, le foie). Une exception à cette règle paraît avoir été donnée par MARNAY [245] qui a décelé un très faible pouvoir cholinestérasique dans la rate de Cheval qui pourtant, d'après DUDLEY et d'autres auteurs, est si riche en acétylcholine.

Cependant, cette règle reste en général vraie. NACHMANSON [264-265], en effet, a pu, par des déterminations manométriques, la vérifier aux divers étages du névraxe. Précisant les données des STEDMAN (1935) qui avaient trouvé les ganglions de la base plus actifs sur l'AC que le cortex, il a constaté que les régions les plus riches en cholinestérase sont, en gros, précisément celles que BARSOUM [24] avait trouvé les plus riches en acétylcholine : noyau lenticulaire, noyau caudé, thalamus, cortex, substance blanche, par ordre décroissant d'activité. Les fibres non myélinisées seraient beaucoup plus riches en estérase que les autres. Les racines ventrales de même le seraient davantage que les dorsales ; la rétine paraît être un des tissus les plus actifs à ce point de vue.

Dans le muscle, la plaque motrice est plus active que la fibre musculaire elle-même, et cette activité ne disparaît pas après dégénérescence du nerf. Chez l'embryon, elle augmente pour atteindre son maximum à la nais-

sance et diminuer ensuite jusqu'à l'âge adulte (NACHMANSOHN [266]).

Chez les Invertébrés.

En 1935, AMMON [6], GAUTRELET et HALPERN [145] virent la forte activité estérasique de l'hémolymphe d'*Helix*, et de l'extrait de muscle de Sangsue (AMMON). De son côté, BACQ [14-15] apporta la preuve de l'existence généralisée de cholinestérase chez des Mollusques (sang d'*Octopus*, *Aplysia*, *Pectunculus*, sang et muscle du pied de *Murex*), des Vers, Echinodermes (muscles d'*Holothuria*) ainsi que dans les tissus des Ascidies (*Ciona* et *Styela*). Au contraire, les organes et le sang des Crustacés étudiés par lui (*Palinurus*, *Carcinus*, *Maia*, *Squilla*, *Peneus*, *Homarus* et *Lepas*) ne se révélèrent d'aucune activité à ce point de vue, de même que le sang d'Insectes (*Pimelia*, *Anacridium*, *Deilephila*), et des tissus d'Eponges et de Cœlentérés (*Alcyonum*, *Rhizostoma*, *Adamsia*). Mais après de nouvelles investigations [16], il dut corriger certaines de ces données en décelant une estérase aussi active dans les muscles des Crustacés (Homard) que dans ceux de Mollusques et d'Echinodermes (BACQ et NACHMANSOHN [269]). D'autre part, MARNAY et NACHMANSOHN [247] ont révélé l'intense activité hydrolytique du système nerveux de Homard vis-à-vis de l'acétylcholine, activité nettement plus grande dans les ganglions que dans le reste de la chaîne, et environ 20 fois supérieure à celle du nerf myélinisé de Grenouille.

NATURE ET ROLE DE LA CHOLINESTÉRASE

Nous n'insisterons pas longuement en terminant sur sa nature : STEDMAN (E. et A.) et EASSON [296] tentèrent de l'extraire du sang de Cheval et de la purifier sans donner sur elle beaucoup de renseignements précis et sans d'ailleurs pouvoir affirmer qu'elle ne se confond pas avec la lipase du sérum. Elle paraît en tous cas différente de la lipase hépatique. Dans un travail plus récent (1937), EASSON et STEDMAN [102] en établirent de façon plus nette la spécificité.

Son action ne se fait pas spécifiquement sur l'ester acétique, mais aussi, à un degré moindre pourtant, sur d'autres esters de la choline : formique, propionique, benzoïque, ainsi que sur l'ester éthylique de la bétaine, mais non sur l'ester carbamique de la choline. Il existe enfin des différences entre le comportement de l'estérase extraite du muscle de Sangsue et celle du muscle de Grenouille, la première hydrolysant l'ester acétique de la β méthylcholine que ne toucherait pas la seconde (KAHANE et J. LÉVY [201]).

Son mécanisme d'action qui se ramène à une hydrolyse, paraît assez simple et il ne semble pas que l'on puisse retenir à l'actif de la cholinestérase seule une démolition plus poussée du groupe choline, ainsi que le suggéraient VILLARET, J. BESANÇON et CACHERA [313], ni une inactivation de l'acétylcholine par passage à un état dissimulé. KAHANE [195] qui avait pensé un instant

à la possibilité de ce dernier mécanisme a dû l'abandonner après des expériences précises.

Il est probable pourtant que son rôle dans les tissus ne se limite pas à l'hydrolyse pure et simple de l'acétylcholine afin d'empêcher la diffusion et la persistance de ce corps actif, après chaque phénomène de transmission chimique ; il n'est pas impossible qu'elle ait, par réversibilité de son action, une fonction synthétisante de l'acétylcholine dans certaines conditions, comme ABDERHALDEN et PAFFRATH [1-2], AMMON et KWIATKOWSKI [7] l'ont admis pour le cas de l'intestin.

CHAPITRE IV

Mode d'action et rôle de l'acétylcholine dans les tissus

La présence d'acétylcholine d'une part, de cholinestérase destinée à en localiser les effets, d'autre part, ne suffit pas à en expliquer complètement, de façon satisfaisante, le mécanisme biologique d'action. Et notamment il est indispensable de poser clairement la question de l'état ou des états, sous lesquels elle se trouve dans les tissus.

LES ÉTATS DE L'ACÉTYLCHOLINE DANS LES TISSUS

Depuis longtemps, à la suite d'expériences, montrant que les diverses techniques d'extraction chimique peuvent faire apparaître d'assez fortes quantités d'acétylcholine (KAPFHAMMER et son Ecole [211-41-42]), ou décelant l'apparition progressive de l'acétylcholine dans

certaines organes (CHANG [68], pour le placenta), et à la suite de constatation de doses importantes d'esters de la choline dans des tissus très riches d'activité cholinestérasiqne (CHANG et GADDUM [69]) on a dû se demander s'il n'existerait pas un « état dissimulé » de l'acétylcholine dans les tissus, état ne permettant ni l'attaque par l'ésérase, ni l'action biologique sur les organes effecteurs que seul aurait l'ester libéré de ce complexe.

Plusieurs travaux ont, durant ces dernières années considérablement renforcé cette opinion. KAHANE et J. LÉVY [197-203], d'un côté parvenaient à libérer du sang traité par l'eau bouillante une substance ressemblant à l'acétylcholine par son action biologique, mais cette libération restait fort irrégulière, sans que les auteurs aient pu encore en définir les raisons. D'un autre côté, GAUTRELET et ses élèves [78] (CORTEGGIANI dans sa récente thèse [77] 1938) constataient le développement d'une activité acétylcholinique dans les suspensions éserinées de cerveau, sous l'influence du chauffage à 70° pendant 3 minutes. Cette augmentation d'activité fut interprétée comme résultant de la démolition d'un complexe. Sur sa nature et son comportement, E. CORTEGGIANI a pu apporter quelques précisions : il est insoluble dans l'eau et dans NaCl à 9 ‰, détruit par les acides, l'alcool, l'acétone, l'acide trichloracétique ainsi que par la congélation, la dessiccation et en partie par l'électrolyse. Détruit rapidement en milieux aqueux, il est cependant stabilisé par l'ésérine et par NaCl à 9 ‰, il a pu être reconstitué par CORTEGGIANI, CARAYON-GENTIL, GAUTRELET et KASWIN [80], *in vitro* par addition d'acétylcholine à la suspension aqueuse de cerveau et

cette reconstitution ne leur parut pas consister en une simple adsorption mais en un phénomène de synthèse véritable. Le complexe paraît exister surtout dans les centres nerveux ; aussi bien dans les ganglions cérébroïdes des Mollusques que dans le cerveau des Vertébrés. On l'a d'ailleurs aussi décelé dans l'intestin. Dans le foie, un mécanisme différent paraît entrer en jeu : la libération d'A. C. observée revêt ici l'aspect d'une action diastasique, alors que ce qui se produit par chauffage de la suspension de cerveau est une libération physico-chimique.

La *nature du complexe* reste encore obscure : sans doute s'agit-il d'une liaison avec les protéides, et non d'une simple adsorption (ING et WRIGHT [173-174], VAN OETTINGEN et BOWMAN [272]) mais plutôt d'une liaison chimique véritable de l'acétylcholine, base forte par son groupe ammonium substitué, aux carboxyles des protéides, selon CLARK [73]. LOEWI [234-235] admet au contraire qu'il s'agit d'une liaison avec les lipides du complexe lipo-protéidique. KAHANE [196] pourtant suggère quelques hypothèses différentes : modifications de l'électro-valence de l'azote de l'ammonium quaternaire, ou encore modification au niveau de la fonction ester, du radical acétyl : changement de l'acide acétique en acide orthoacétique par addition d'une molécule d'eau, ce qui pourrait avoir pour effet, par la profusion des oxyhydriles créés, de favoriser des liaisons en chaînes longues et la formation de molécules fortement condensées. Mais ceci n'est qu'une hypothèse ingénieuse.

Il apparaît donc que dans la plupart des tissus, l'acétylcholine existe sous deux formes au moins :

1° A. C. libre, diffusible, active et attaquable par l'estérase.

2° A. C. *dissimulée*, complexe, inactive, libérable par divers agents physiques et chimiques.

La transformation d'un état dans l'autre se fait sans doute sous des influences encore bien mystérieuses, où l'ion K^+ (HOWELL, BROWN et FELDBERG [53]) et peut-être la vitamine B 1 ont leur rôle à jouer. MINZ [257-258] n'a-t-il pas montré récemment que la substance sensibilisatrice libérée par l'excitation électrique du nerf vague n'est autre que cette vitamine antinévritique ? D'après lui l'aneurine phosphorylée qui sensibilise les réactifs biologiques à l'acétylcholine sans avoir d'action anticholinestérasique, paraît jouer un rôle co-fermentaire dans la formation ou la libération de l'ester cholinique.

Signalons enfin que QUASTEL, TENNENBAUM et WHEATLEY [283], MANN, TENNENBAUM et QUASTEL [240] ont observé un processus de synthétisation d'acétylcholine par le cerveau à 37° en milieu oxygéné ; CORTEGGIANI [77] confirma ces données et retrouva en même temps une augmentation de l'acétylcholine libre et de la portion dissimulée ; et sans doute d'après STEDMAN [300] (1937) est-il logique de penser que dans ces phénomènes les produits de dégradation des glucides ont leur importance. Un processus de synthèse à partir de la choline d'une part, de l'acide pyruvique, par oxydation et décarboxylation, ou mieux de l'acide acétylacétique, dans leur forme énolique, d'autre part, a été envisagé par E. et E. STEDMAN [300]). La deuxième manière de voir

paraît reposer sur une certaine base expérimentale ; dans cette synthèse interviendrait un mécanisme enzymatique. Récemment, d'ailleurs, MANN, TENNENBAUM et QUASTEL [240] ont vu cette synthèse, aboutissant à l'acétylcholine par l'intermédiaire d'un « complexe », se produire dans le cerveau en présence de glucose et de lactate ou pyruvate de Na, en aérobiose ; ils donnent de ces faits une représentation schématique.

Il semble, en tous cas, que ce soit au passage de la seconde forme (complexe) à la première (libre) plutôt qu'à un mécanisme de re-synthèse, qu'est dûe la formation d'acétylcholine dans les phénomènes biologiques où l'on s'accorde à lui reconnaître un rôle de plus en plus étendu.

LE RÔLE DE L'ACÉTYLCHOLINE DANS LES TISSUS (1)

Depuis les célèbres expériences de LOEWI [232], on a soupçonné le rôle que cette substance hypothétique, qui ressemblait tant à l'acétylcholine, devait jouer dans la physiologie normale. Ce « Vagusstoff » libéré par l'excitation vagale dans le perfusé et capable de reproduire les effets de cette stimulation sur un réactif

(1) Nous n'aurons pas en vue ici le rôle thérapeutique de l'A.C. On pourrait se reporter aux mémoires de SIMONART et de VILLARET, JUSTIN-BESANÇON et CACHERA en particulier. Quant à l'étude du comportement de l'A.C. des tissus et de la cholinestérase en clinique, elle est à peine esquissée. Signalons les travaux de TOD et MAXWELL JONES (*Edimburg med. Jour.* 1937, 44, 46) en psychiatrie, de SCOZ et CATTANEO (*Enzymologia*, 1937, 4, 157) dans la tuberculose, enfin HALL et LUCAS (*Jour. Pharmac.* 1937, 59, 34) et VEREBELY (*Kl. Woch.* 1937, 46, 851).

témoin, a vu son domaine s'agrandir démesurément au fur et à mesure que les recherches biochimiques et physiologiques se précisèrent. L'« hormone vagale » dont le rôle paraissait d'abord se limiter au territoire du X, où elle reste cependant prépondérante (CHANG et GADDUM [69], BINET et MINZ [38]), puis à tout le système parasympathique, a été trouvée presque partout, dépassant singulièrement ce domaine. Le sympathique lui-même, dans ses fibres préganglionnaires paraît reconnaître aussi l'acétylcholine comme médiateur (FELDBERG et GADDUM [114], KIBIAKOW [213]), alors que ses fibres post-ganglionnaires sont « adrénériques ». Particulièrement éloquent est le cas de la surrénale assez riche en acétylcholine (CHANG et GADDUM [69], FELDBERG et SCHILD [117]) et dont le tissu chromaffine est, au dire des physiologistes contemporains, assimilable à un ganglion sympathique, les fibres du splanchnique qui s'y rendent se comportant comme des fibres préganglionnaires. Tout porte à croire que l'excitation de ces nerfs déclenche la sécrétion de l'hormone vasoconstrictrice par l'intermédiaire de l'acétylcholine. Cette dernière s'avère, en effet, un puissant adrénalino-sécréteur, non seulement sur la glande normale (HOUSSAY et MOLINELLI [170], FELDBERG et MINZ) mais aussi sur la glande dont l'innervation a dégénéré (HERMANN, JOURDAN, MORIN, et VIAL [162]). Ces mêmes expérimentateurs ont vu l'ésérine renforcer cette action, comme elle renforce les effets de la stimulation faradique du splanchnique (FELDBERG, MINZ et TSUDZIMURA [115]). Si l'on ajoute que l'atropine, à dose suffisante, abolit la sécrétion d'adrénaline consécutive à la faradisation du splan-

nique (LEWIS et LUDUENA [229]), on conviendra que ce faisceau d'arguments confirme que cette innervation préganglionnaire comporte l'acétylcholine comme médiateur. Rappelons enfin que les recherches de H. HERMANN et de ses collaborateurs [163 et suiv.] permettent d'ajouter que vraisemblablement l'ion K^+ , dont ils ont étudié le pouvoir adrénalino-sécréteur renforcé par l'ésérine, joue ici un rôle dans la série de réactions chimiques aboutissant à la libération du médiateur, de même que BROWN et FELDBERG [53] l'ont démontré dans les articulations synaptiques ganglionnaires.

Dans les *synapses du système nerveux central*, l'intervention de l'acétylcholine comme médiateur, envisagée par DALE [84 bis] et LOEWI [223], SHERRINGTON FULTON, paraît très probable à la suite des travaux de ROSENBLUTH, DIKSHIT [94-95], des STEDMAN [300] qui ont pu isoler l'acétylcholine chimiquement dans le système nerveux central. ECCLES [103], cependant, n'admet le rôle du médiateur cholinergique que dans les organes à réaction lente et non dans le système nerveux central, à cause de l'insuffisance de l'activité cholinestérasique à ce niveau pour hydrolyser l'A. C. formée, pendant la période réfractaire. Mais les recherches très récentes de NACHMANSOHN [262 et suiv.], rapportées au XVI^e Congrès International de Physiologie (Zürich 1938) semblent bien prouver que la concentration d'enzyme est localement assez élevée pour permettre l'hydrolyse de la quantité nécessaire d'acétylcholine, durant une période très courte, de l'ordre de la milliseconde ; ceci rend tout à fait acceptable la théorie de la médiation cholinergique au niveau des synapses centrales.

Une discussion semblable s'est présentée à propos de l'intervention de l'acétylcholine dans le déclenchement de la *contraction du muscle strié*. DALE et FELDBERG [87], BROWN, DALE et FELDBERG [52], avaient en effet démontré la libération d'acétylcholine dans le muscle strié du Chat, et obtenu la contraction de ce muscle par injection rapide d'acétylcholine dans l'artère. D'un autre côté, opérant sur le muscle de Léopard, BUCKTAL et LINHARDT [57] parvenaient, par micromanipulation, à obtenir électivement la contraction par application de petites quantités d'acétylcholine sur la plaque motrice. Malgré des résultats peu concluants sur le muscle de Chat, MARNAY et NACHMANSOHN [249] ont réussi, par comparaison entre les parties aneurales et neurale du muscle couturier de Grenouille, à déterminer la localisation particulièrement précise de la cholinestérase au niveau des terminaisons nerveuses, ce qui permet d'adopter la théorie de DALE. On a d'ailleurs montré l'action de l'acétylcholine *in vitro* sur le métabolisme musculaire : accélération de la glycolyse et décomposition du phosphagène (MARNAY et NACHMANSOHN [242-243-246]), ainsi que le parallélisme entre l'activité cholinestérasique du muscle et sa teneur en phosphagène. La chronaxie varie d'ailleurs en raison inverse de ces deux éléments (MARNAY [244]) ; on peut ainsi peut-être saisir le lien entre la théorie chimique et la théorie électrique de Lapicque pour la transmission de l'influx dans la plaque motrice.

Comme on le voit, le rôle de l'acétylcholine paraît extrêmement général. Même, à supposer qu'il faille encore faire certaines réserves, s'il est exact, comme tout

porte à le croire, que cette substance représente le médiateur de tout le système para-sympathique et du système sympathique, il n'en est pas moins établi qu'elle intervient dans la plupart des fonctions végétatives et glandulaires. DALE et FELDBERG [86] ont démontré le passage d'acétylcholine dans les veines gastriques pendant la stimulation du vague chez l'animal éseriné. R. GAYET et MINZ [148-149] ont vu un fait semblable dans la veine pancréatico-duodénale après excitation du splanchnique, et après injection d'ergotamine. On connaît en clinique l'action de l'acétylcholine sur les sécrétions gastrique et pancréatique.

Pour certains auteurs, des substances choliniques interviendraient dans l'automatisme de l'intestin et le péristaltisme (LE HEUX [223], FELDBERG et ROSENFELD [116], DEMOOR [92]). Et vraisemblablement bien rares doivent être les actes physiologiques où l'acétylcholine n'ait en quelque façon à intervenir.

Chez les Invertébrés.

La généralisation de la théorie cholinergique de la transmission de l'influx nerveux se heurte chez les Invertébrés à de sérieuses difficultés. Si on a pu la démontrer chez les Vers (BACQ et COPPÉE [19]), il n'en fut pas de même chez les Mollusques Céphalopodes, dont pourtant les muscles sont sensibles à l'acétylcholine (RIESSER [289], BACQ [16]) et dont les ganglions renferment une forte quantité d'acétylcholine (obs. de BACQ chez *Octopus* [12]). BACQ n'a pu obtenir de contraction par application locale d'A. C. sur le ganglion

même après ésérinisation. L'ésérine d'ailleurs, contrairement à ce qui se passe chez les Vers, n'augmente pas la réponse du muscle à l'action directe de l'acétylcholine, alors qu'elle inhibe très fortement la cholinestérase de ces animaux ; fait en contradiction avec les données admises sur le mécanisme cholinergique chez les Vertébrés (BACQ et COPPÉE [18]).

Chez les *Crustacés*, au contraire, si le nerf est sensible aux fortes concentrations d'acétylcholine, comme BACQ l'a mis récemment en évidence, le muscle reste insensible, et dans ces conditions « l'acétylcholine ne peut être l'intermédiaire entre la terminaison nerveuse et la fibre motrice » (BACQ [16]). Il en est ainsi *a fortiori* chez les Actinies qui, insensibles à l'acétylcholine, sont dépourvues de cholinestérase.

Nous n'insisterons pas plus sur ces faits qui indiquent qu'on ne peut appliquer intégralement aux Invertébrés la théorie de transmission chimique de l'influx nerveux admise chez les Vertébrés ; le mécanisme d'action et le rôle exact de l'acétylcholine qu'on rencontre chez ces animaux restent en grande partie encore obscurs. Nous verrons d'ailleurs, dans nos recherches personnelles, une illustration de ce fait.

DEUXIÈME PARTIE

Recherches Personnelles

Nous exposerons maintenant :

— D'abord les techniques que nous avons employées pour le dosage de l'acétylcholine dans les tissus et pour l'appréciation de l'activité cholinestérasique.

— Ensuite nos résultats de recherches : 1) chez les Invertébrés (Mollusques et Crustacés) ; 2) chez les Animaux supérieurs : en particulier, chez le Cobaye et dans divers organes humains.

— Chemin faisant, nous nous arrêterons quelque peu sur des expériences d'ordre plus général, portant sur l'état de l'acétylcholine dans certains tissus, sur des essais d'inactivation de la cholinestérase *in vivo* et sur la destinée de l'acétylcholine injectée à l'animal.

CHAPITRE PREMIER

Les techniques

TECHNIQUE DE DOSAGE BIOLOGIQUE DE L' « ACÉTYLCHOLINE-ÉQUIVALENT » DANS LES TISSUS

Nous avons expérimenté et utilisé au cours de nos recherches le muscle dorsal antérieur éseriné de Sangsue dont les propriétés sont depuis FÜHNER, bien connues, et que MINZ a érigé en une méthode de dosage dont les qualités ont justifié la vogue durant ces dernières années.

Le principe en a été donné, dans la première partie de cet exposé. Nous n'y reviendrons pas, mais nous insisterons seulement sur les points particuliers de cette technique.

1. — Préparation du muscle de Sangsue-réactif.

Une Sangsue, de taille assez forte, est fixée, la face dorsale contre une plaque de liège. On sectionne les deux extrémités avec leurs ventouses ; puis, à l'aide de fins ciseaux, on découpe la face ventrale de chaque côté, en suivant la ligne jaune bien marquée sur le tégument. On libère alors la paroi dorsale de tous les viscères et ganglions nerveux, avec précautions, jusqu'à ce qu'il ne reste aucune tache blanche à son contact. Pendant ces opérations, il est recommandé de maintenir le muscle humide, en l'imbibant de temps en temps d'un peu de solution de Ringer (1). Le muscle peut être employé tel quel, mais en général, nous préférons le sectionner en deux dans le sens de la longueur, de façon à avoir des lanières plus étroites dont on prélève un lambeau de 4 à 5 cm. sur la partie antérieure qui est la plus sensible (KAHLSON et UVNAS). On laisse au repos en Ringer pendant 1 ou 2 heures ; puis on attache chaque extrémité à un fil et le muscle ainsi préparé, est fixé dans la cuve et au levier du myographe.

Pour nos expériences, nous nous sommes servi du myographe de Kruta et d'une cuve cylindrique de verre, de contenance de 15 à 20 cc. à la partie inférieure de laquelle était adapté un bouchon de caoutchouc avec système permettant l'évacuation facile des liquides et l'entrée d'air ou d'oxygène.

(1) La solution de Ringer habituellement employée pour ce dosage est la suivante :

NaCl : 6,5 ; KCl : 0,14 ; CaCl² : 0,12 ; CO³NaH : 0,20.

Eau dist. : 1.000 cc.

Après immersion dans de la solution de Ringer ésérinée (1) à 1/200.000, pendant 20 à 30', la préparation peut servir pour le dosage.

2. — Préparation des extraits.

Deux façons de procéder nous ont servi à extraire l'acétylcholine des tissus :

— L'extraction simple en Ringer ésériné. Les organes immédiatement prélevés, pesés et reçus dans du Ringer ésériné, sont broyés très finement au mortier avec du sable de Fontainebleau lavé ou du verre neutre pilé, dans la même solution ésérinée. Après une heure environ de contact, l'extrait dilué ou non, selon le cas, sert à l'essai biologique.

— L'extraction trichloracétique, selon la méthode préconisée par CHANG et GADDUM [69]. Les organes pesés, reçus dès leur prélèvement dans 5 à 10 cc. de solution trichloracétique à 10 %, sont broyés et filtrés après un certain temps de contact. Le filtrat, augmenté du produit de lavage du filtre, est agité avec de l'éther, dans une petite ampoule à décantation, à 4 ou 5 reprises pour éliminer l'excès d'acide trichloracétique. On note souvent alors l'apparition d'un louche plus ou moins intense, mais le liquide reste nettement acide. L'extrait est alors porté au B. M. vers 50° pendant quelques minutes, pour éliminer l'éther qui reste ; puis on

(1) Préparée à l'aide de sulfate d'ésérine cristallisé que les Laboratoires HOUDÉ nous avaient très obligeamment fourni.

concentre ou même dessèche complètement dans le vide.

Repris alors par un volume connu de solution de Ringer, ésériné ou non, selon l'essai que l'on veut faire, l'extrait peut servir au dosage après neutralisation exacte au moment de l'emploi.

Les extraits obtenus par cette méthode, restant nettement acides, peuvent être conservés à la glacière, pendant quelques jours, sans perte appréciable d'acétylcholine. Les extraits en milieu simplement ésériné sont de conservation beaucoup moins bonne, probablement par action de la cholinestérase à la longue malgré l'ésérine.

Les autres procédés d'extraction : alcoolique, acétonique, etc., que nous avons cités plus haut, n'ont pas été employés par nous couramment dans nos dosages.

3. — Dosage proprement dit.

Le muscle étant préparé et monté sur le myographe, le dosage consistera, après sensibilisation par l'ésérine, à inscrire ses contractions, et à les comparer à celles données par des solutions-étalons de chlorure d'acétylcholine.

Comme étalons, nous avons préparé une solution-mère faite à l'aide de chlorure d'acétylcholine chimiquement pur et sec (1), conservé dans le vide, et pesé très rapidement lors de la préparation de la solution titrée.

(1) Nous remercions bien vivement les Laboratoires LEMATTE et BOINOT pour le stock de chlorure d'A.C. qu'ils ont bien voulu nous fournir.

toutes précautions prises à cause de la très forte hygroscopie de ce composé.

Cette solution à 1 ‰ était faite dans l'eau distillée, acidifiée par HCl, N/10 jusqu'à pH = 4, et, additionnée d'un cristal de thymol, elle était conservée en flacon coloré, bien bouché, à la glacière et à l'obscurité. Le pH de cette solution doit être vérifié de temps en temps ; elle se conserve bien, mais il est recommandé de la refaire tous les 2 ou 3 mois. A partir d'elle, on prépare au moment du dosage, une solution à $1 \cdot 10^{-5}$ ou $1 \cdot 10^{-6}$ qu'on dilue à son tour en Ringer ésériné à 1/200.000, de façon à faire toute une gamme-étalon de concentrations : $1 \cdot 10^{-7}$; $0,5 \cdot 10^{-7}$; $0,25 \cdot 10^{-7}$; $0,125 \cdot 10^{-7}$; $0,625 \cdot 10^{-8}$; correspondant à 100 γ ; 50 γ ; 25 γ ; 12 γ 5 ; 6 γ 25 de chlorure d'A. C. par litre ; on peut diluer plus loin, selon la sensibilité du muscle.

Les courbes de contraction du muscle, sous l'action de l'extrait, et des étalons, sont enregistrées pendant 3 minutes, soit sur papier enfumé, soit à l'aide d'un style inscripteur léger sur papier glacé et quadrillé, comme nous l'avons fait le plus souvent, le cylindre tournant lentement : 1 cm. 6 à la minute et l'amplification étant de 5.

On commence par l'essai des concentrations les plus faibles car la détente du muscle après lavage est alors plus facile et moins longue. Pour plus de précision, on peut construire la courbe de contraction du muscle ; en abscisses on porte les concentrations en Chlorure d'A. C. des divers étalons, en ordonnées l'amplitude de la contraction qui y répond. La courbe a l'aspect donné par la figure ci-contre (fig. 4). Il est facile en s'y reportant

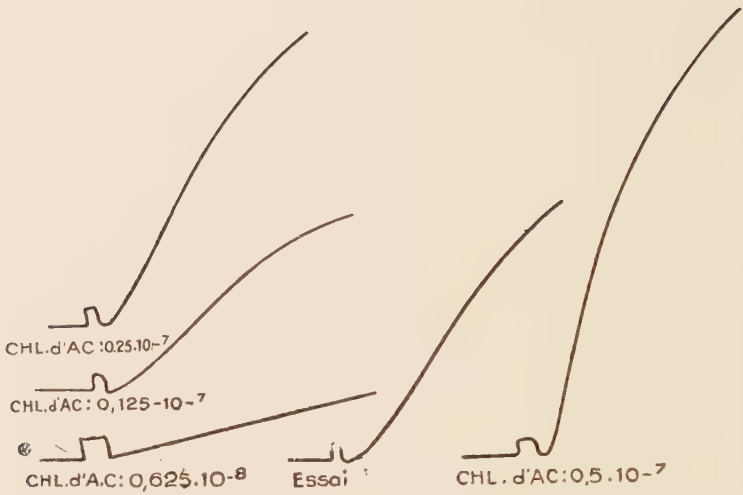


FIG. 3. — Muscle dorsal antérieur éseriné de Sangsue. Action de solutions-étalons de chlorure d'acétylcholine à diverses concentrations. Durée de contraction : 3 minutes.

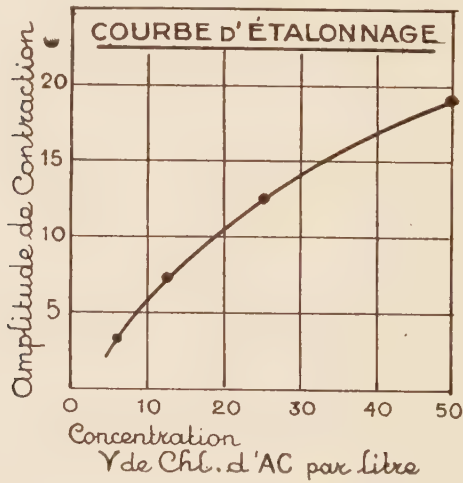


FIG. 4. — Courbe d'étalonnage obtenue à partir des essais de la figure précédente (fig. 3).

de déterminer la concentration en chlorure d'A. C. de la solution essayée et d'en déduire par suite le poids de chlorure d'A. C. contenu par gramme d'organe.

Cette méthode permet une approximation à 10-20 % près.

La figure 3 montre des tracés illustrant cette technique la courbe d'étalonnage obtenue (à noter que le muscle employé pour ce dosage n'était pas très sensible.

Remarques.

En ce qui concerne la *sensibilité* du muscle de Sangsue, nous l'avons trouvée notablement moins élevée que d'autres auteurs, et notamment nous ne l'avons vu atteindre qu'assez exceptionnellement $1/10^0$. Par contre, normalement, la zone de concentration optima pour la sensibilité du dosage s'étend presque toujours entre $1/10^7$ et $1/10^8$.

De plus la sensibilité varie parfois au cours d'une expérience lorsqu'elle se prolonge. Après une série de mesures, le muscle se désensibilise progressivement, mais non toujours. On peut attribuer ce fait à l'existence de substances inhibitrices et désensibilisantes dans certains extraits d'organes, mais parfois il se produit spontanément. Principalement après une contraction maximale violente, on peut voir la préparation perdre toute sensibilité et devenir inutilisable. Aussi des précautions importantes s'imposent-elles. D'abord éviter de provoquer des contractions maximales, diluer largement les liquides d'essai. Ensuite faire plusieurs

étalonnages : avant, pendant et après chaque série de dosages, afin de vérifier que le réactif a gardé toute sa sensibilité ; il est préférable d' « encadrer » toute mesure par deux étalonnages de façon à obtenir des chiffres moyens plus exacts. De même, on a intérêt à préparer en même temps, plusieurs Sangsues de façon à pouvoir essayer un certain nombre de lambeaux musculaires.

Cette sensibilité varie quelque peu (mais en moyenne relativement peu) selon les individus, mais surtout, nous l'avons constaté nettement, selon les saisons. Certains auteurs avaient déjà remarqué la sensibilité médiocre des Sangsues d'été par rapport à celles d'hiver. L. FRANEL [127] conseillait, selon la formule de WACHOLDER [324], de modifier la composition du liquide de Ringer selon la saison (1), en faisant varier les doses de Ca^{++} et de K^+ . Nous avons employé ce Ringer d'été et les résultats n'ont pas été d'une grande netteté. Nous avons de même essayé de modifier les taux d'ésérine pour la sensibilisation, sans réussir à coup sûr.

Pour la marche du dosage lui-même, CHANG et GADDUM [69] qui avaient essayé ce test, l'abandonnèrent à cause des difficultés de la décontraction, le muscle ne revenant pas à sa longueur primitive. Nous avons observé ce fait sur certaines préparations. Aussi pour corriger cette erreur, notions-nous, avant chaque contraction, la longueur du lambeau musculaire, afin de

(1) *Ringer d'été* (formule WACHOLDER, selon FRANEL) : NaCl : 6,27 ; KCl : 0,05 ; CaCl_2 : 0,29 ; $\text{PO}_4\text{H}^3\text{n}$: 1,81 ; H_2O : 1.000'' ; CO_3Na^2 : q.s.p. $\text{pH} = 7,4$. *Ringer d'hiver* : NaCl : 6,27 ; KCl : 0,10 ; CaCl_2 : 0,10 ; $\text{PO}_4\text{H}^3\text{n}$: 1,81 ; CO_3Na^2 : q.s.p. $\text{pH} = 7,4$.

pouvoir, lors des calculs, faire la correction nécessaire. En général, cependant, la décontraction se faisait normalement en 5 à 10 minutes très complètement, sauf après les contractions extrêmement intenses et prolongées. Elle était beaucoup plus rapide sur les lambeaux minces, lorsque le muscle avait été divisé en deux dans le sens de la longueur.

D'autre part, ayant remarqué qu'après quelques essais, le muscle, pour une solution de même teneur en acétylcholine, se contractait moins rapidement, mais atteignait cependant, quoique après un temps plus long, un même plateau de contraction (courbes I et II, fig. 5), nous nous sommes demandé s'il ne serait pas préférable, de prolonger chaque contraction jusqu'à ce que ce plateau soit atteint au lieu de l'arrêter en pleine ascension au bout de 3 minutes comme on le fait d'habitude. On voit dans la figure ci-contre une représentation de ce fait. Nous avons opéré de cette façon pour quelques dosages. En réalité, l'avantage obtenu paraît compensé par l'inconvénient d'une contracture plus longue et, partant, d'une décontraction beaucoup plus difficile. La manière habituelle de procéder est sans doute préférable, à condition de faire de nombreux essais-étalons.

Dans le même ordre d'idées, pour éviter de nombreuses contractions et décontractions successives, ces dernières toujours assez longues et parfois imparfaites, nous avons pu voir que pour chaque concentration d'acétylcholine, le plateau de contracture est au même niveau, à peu de chose près, que l'on opère après relâchement du muscle (contractions successives) ou que l'on opère en faisant que la contraction plus forte

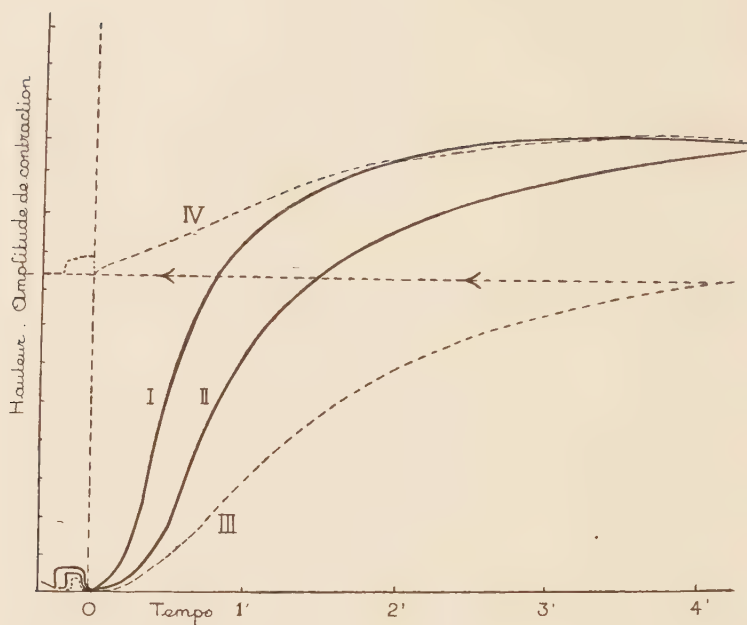


FIG. 5. — Tracés de contractions d'une même préparation de muscle ésériné de Sangsue, en présence de solutions-étalons de chl. d'A. C. à des moments différents et dans des conditions diverses.

I. Sol. de chl. d'A.C. $0,25.10^{-7}$ (1^{re} contraction du muscle après sensibilisation).

II. Sol. de chl. d'A.C. $0,25.10^{-7}$ (contraction obtenue plus tard, après plusieurs essais).

III. Sol. de chl. d'A.C. $0,125.10^{-7}$.

IV. Sol. de chl. d'A.C. $0,25.10^{-7}$ ajoutée après l'essai III, sans décontraction intermédiaire (contraction « additive »).

Le cylindre tournait plus vite que dans les tracés fig. 3 (réduit de $\frac{1}{2}$).

s'ajoute à la précédente plus faible, une fois le plateau obtenu (contractions additives). Nous reproduisons un tracé ci-contre qui illustre cette donnée (courbes III et IV, fig. 5). Cette manière de faire, pensions-nous, pourrait gagner du temps lors de l'étalonnage. Mais l'usage nous révéla que si certaines préparations s'y prêtent bien, le plateau de contracture étant net et rapidement obtenu, d'autres n'arrivent que très tardivement à un plateau d'ailleurs imparfait, ce qui enlève à la méthode ainsi appliquée beaucoup de sa précision.

Enfin sur la *spécificité* de réaction du muscle de Sangsue, nous avons seulement expérimenté personnellement l'action de la créatine et de la créatinine qui, selon EMMELIN et KAHLSON [107], le sensibiliseraient. Nous n'avons constaté qu'une très faible sensibilisation mais aucune action directe même à forte concentration.

Action de certains antiseptiques sur le muscle de Sangsue. — Par contre, nous avons remarqué que des solutions de Ringer conservées pendant un certain temps avec quelques cristaux de *thymol*, provoquaient lorsqu'on les mettait en présence de la préparation de Sangsue des contractions irrégulières, rythmiques et la désensibilisation ultérieure. Ces inconvénients n'apparaissent plus lorsque la solution ainsi conservée était diluée au moment de l'emploi ; si bien qu'on peut sans risque ajouter du thymol comme antiseptique à la solution-étalon à 1/1000 qu'on dilue dans de très grandes proportions, au moment du dosage.

Un fait analogue est facilement constaté avec le Ringer additionné de *toluène* qui, on le voit sur le tracé

ci-contre, provoque des contractions rythmiques, désordonnées pendant un temps assez long ; de même avec l'alcool octylique, que nous avons essayé en sa qualité

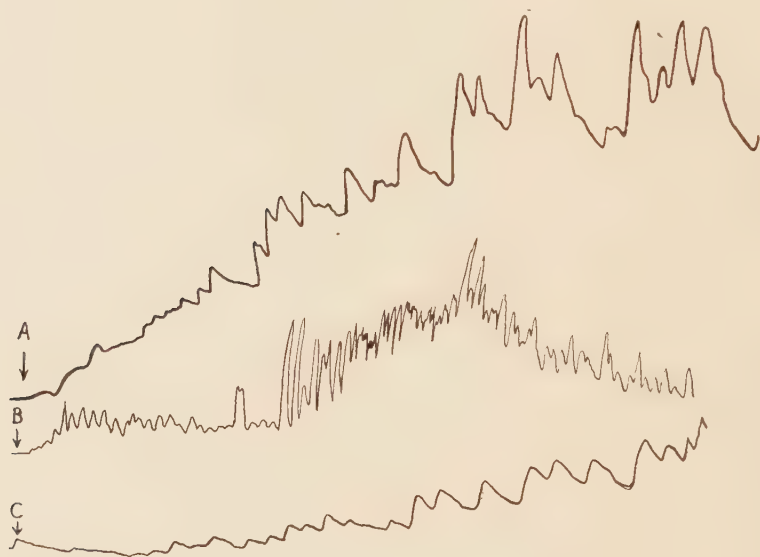


FIG. 6. — Contractions désordonnées du muscle de Sangsue en présence de Ringer additionné de :

- A. Thymol.
- B. Conservé sous toluène.
- C. Saturé d'alcool octylique.
(réduction de $\frac{1}{2}$).

d'abaisseur puissant de la tension superficielle. On a d'ailleurs déjà montré des actions semblables par la vérratine (FONTAINE [123], CORTEGGIANI [77]) la spartéine, le cyanure d'éthyle (FONTAINE), la quinine, la quinidine (DODEL et DASTUGUE [96]) qui provoquent une activité

rythmique. Il est probable que ces produits se comportent comme des toxiques musculaires.

Nous signalons seulement ces faits en passant ; nous n'en avons pas poursuivi encore l'étude systématique.

TECHNIQUE D'APPRÉCIATION DE L'ACTIVITÉ CHOLINESTÉRASIQUE DES TISSUS ET HUMEURS

Nous ne reviendrons pas sur les diverses techniques proposées dans ce but et exposées ci-dessus, le procédé le plus en faveur et certainement le plus précis étant la méthode manométrique d'AMMON [6], STEDMAN [296], utilisée par NACHMANSOHN, MARNAY, BACQ dans leurs récentes recherches.

N'ayant pu opérer par ce procédé dès le début de nos recherches dans ce domaine, nous avons préféré, afin que nos déterminations fussent toujours comparables entre elles, utiliser la méthode biologique personnelle, évidemment assez peu précise, que nous exposons ci-après.

Principe.

L'extrait d'organe obtenu par broyage en Ringer est dilué progressivement dans une solution de Ringer, contenant du chlorure d'acétylcholine à la concentration de 1.10^{-7} . Après un temps donné de contact à température fixe, les différentes dilutions sont testées au muscle dorsal éseriné de Sangsue. On détermine ainsi la dilu-

tion d'organe pour laquelle le muscle répond par une contraction appréciable, ce qui indique la dilution pour laquelle l'hydrolyse n'est plus complète dans les conditions données (l'hydrolyse complète étant arbitrairement fixée par l'absence de réaction du muscle).

Technique.

Les fragments d'organes prélevés sont pesés et broyés finement dans un volume connu de solution de Ringer, de façon à avoir un extrait au $1/10^6$; après contact on filtre.

D'autre part, en partant d'une solution-étalon, on prépare une certaine quantité de solution de chlorure d'A. C. à $1 \cdot 10^{-7}$ dans le Ringer à $\text{pH} = 7.7, 2$, dont on répartit 10 cc. dans une série de tubes à essais parfaitement propres. On procède alors à des dilutions du filtrat d'extrait en ajoutant les quantités voulues de cet extrait dans la solution d'acétylcholine, de façon à obtenir une gamme de dilution de l'organe étudié à $1/10$, $1/20$, $1/50$, $1/100$, $1/200$, $1/500$, etc., en prolongeant plus ou moins loin selon l'activité présumée de l'extrait (pour certains, nous avons dû atteindre $1/50.000$). On bouche les tubes avec un tampon de coton et on laisse pendant 24 heures en contact à température fixe (37°). On adjoint un tube témoin contenant 10 cc. de la solution d'acétylcholine sans extrait, qu'on laisse dans les mêmes conditions. Le temps de contact étant révolu, on ajoute à chaque tube, une quantité suffisante de solution de sulfate d'ésérine pour avoir la concentration de $1/200.000$, puis on procède à l'essai biologique.

Sur le muscle dorsal antérieur de Sangsue préparé comme il a été dit plus haut, et ésériné, on fait agir d'abord le contenu des tubes les plus concentrés en extrait. D'ordinaire, l'absence totale de réaction indique que l'hydrolyse a été complète ; au fur et à mesure on essaye les solutions plus diluées et pour l'une d'elles, la



FIG. 7. — *Exemple de détermination d'activité cholinestérasique.* — Essais sur le muscle de Sangsue ésériné, de sol. de chl. d'A. C. 1.10^{-7} après contact avec des quantités progressivement décroissantes d'un extrait d'organe, pendant 24 heures à 37° . (Taux de dilution indiqué sur le tracé). T : témoin.

(Réduction de $1/3$).

réponse du muscle se fait par une contraction nette, mais souvent faible ; cette réponse est de plus en plus accentuée pour les tubes suivants moins concentrés en extrait. On fait agir enfin le témoin qui doit provoquer une forte contraction.

Pour prendre un exemple (voir figure 7) l'hydrolyse, complète aux concentrations $1/500$ et $1/1000$ ne l'est plus à partir de $1/2000$. L'activité cholinestérasique est alors évaluée par l'inverse de cette concentration limite. Le plus souvent on situe le « pouvoir cho-

linestérasique » entre la dernière dilution ne donnant pas de réponse, et la première qui en donne une très nette. P. C. E. = 1.000 à 2.000, dans l'exemple donné.

On peut, bien entendu, après un essai préalable, faire des dilutions en progression plus rapprochée pour avoir plus de précision.

Remarques.

Cette technique que nous ne prétendons pas supérieure aux classiques présente certains avantages de commodité : appareillage très simple, facilité relative d'exécution.

Cependant, elle appelle quelques objections. La température fixée à 37°, bien qu'anormale pour des recherches sur les Invertébrés a été choisie à cause des variations très considérables de la température des laboratoires, qui entraînent, comme nous l'avons vérifié lors de nos essais, de très grandes causes d'erreur pour une variation relativement minime.

D'autre part, elle a l'inconvénient de l'action hydrolytique relative de la température même modérée, sur des solutions diluées d'acétylcholine même en milieu neutre. Cependant, à condition d'opérer toujours à $\text{pH} = 7$, sans aller en milieu alcalin, cette action est, dans les conditions données, relativement faible comme le prouve le témoin qui est adjoint à chaque essai. Nous avons employé pour nos essais une solution de Ringer strictement neutre (sans excès de CO^3NaH , et avec tampon de phosphate dont le pH était soigneusement vérifié.

A vrai dire, nous eussions préféré un temps de contact moins long et une température plus basse, mais constante, qui auraient diminué sans doute ces inconvénients. Mais, ayant commencé nos essais selon ce protocole, nous les avons continués exactement dans les mêmes conditions, afin que nos résultats restent toujours comparables entre eux.

Un autre inconvénient réside enfin dans le fait que la dilution-limite cherchée est appréciée par un réactif biologique, l'absence totale de réaction du muscle de Sangsue. Or, ce muscle réactif, même dans des conditions très semblables de prélèvement, d'ésérination, voit parfois sa sensibilité varier considérablement d'un muscle à l'autre, si elle reste sensiblement constante pour une préparation donnée. Néanmoins, cet inconvénient n'est pas rédhibitoire et dans la majorité des expériences, la sensibilité reste pratiquement du même ordre.

Comme on le voit, cette méthode, sans prétendre à une précision très grande, et sans être à proprement parler un dosage, donne cependant une idée assez exacte de la valeur de l'activité cholinestérasique des organes et permet des comparaisons intéressantes.

CHAPITRE II

Recherches sur la répartition de l'acétylcholine et de la cholinestérase chez les Mollusques

L'ACÉTYLCHOLINE DANS LE CŒUR DES MOLLUSQUES

Le point de départ de nos recherches fut la constatation faite par MORIN et JULLIEN [260] d'anomalies fonctionnelles et de réactions pharmacodynamiques curieuses du cœur chez quelques espèces. Nous nous sommes demandé si l'étude de l'acétylcholine dans ces organes ne pourrait pas donner l'explication de certains faits paradoxaux ; en plus de l'intérêt biologique général de la mise en évidence des esters de la choline dans le myocarde des Mollusques qui n'a jamais fait l'objet de recherches systématiques à cet égard. Sur ce sujet,

plusieurs notes ont été déjà publiées par A. JULLIEN et nous-même [317 et suiv.].

La présence dans le cœur de certains Mollusques d'une substance analogue à l'acétylcholine par ses pro-

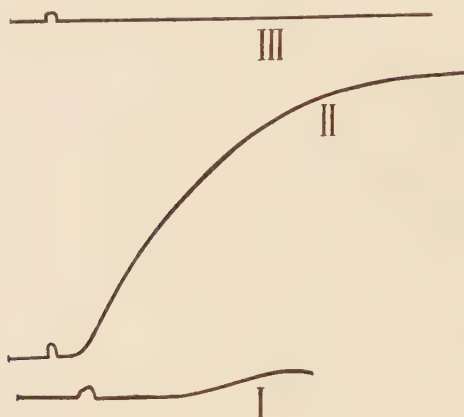


FIG. 8. — Action sur le muscle de Sangsue d'un extrait trichloracétique de cœur d'*Helix pomatia* (0 gr. 725 d'organes dilué à 100 cc.).

I. Muscle non ésériné.

II. Muscle ésériné.

III. Extrait plus concentré, mais traité par le sérum (1 %) 30 minutes, à 37°. Action sur muscle ésériné.

(Réduction de moitié).

priétés biologiques paraît indubitable. Il est facile de la mettre en évidence dans le cœur d' *Helix pomatia*. Le tracé reproduit ci-contre (fig. 8) qui représente l'action d'un extrait trichloracétique de cœur d'*Helix* sur le muscle de Sangsue permet de voir : 1°) l'augmentation

très forte de l'effet par l'ésérine ; 2°) sa disparition par contact avec du sérum ; nous avons de même vu que l'effet est aussi aboli par passage en milieu fortement alcalin (NaOH,N). Faits qui démontrent la présence d'un ester instable de la choline dans cet organe

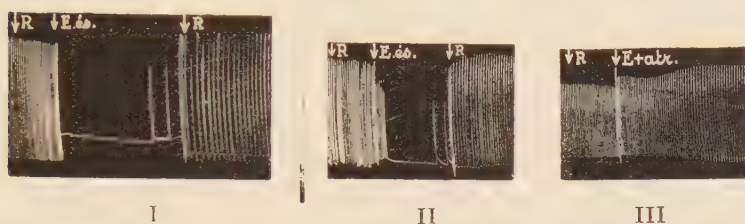


FIG. 9. — Action d'extraits myocardiologiques de Mollusques sur le cœur de Grenouille (technique de STRAUB).

- I. Extrait trichloracétique dilué de cœur de *Murex*.
- II. Broyat de cœur de *Limnæa* en Ringer ésériné.
- III. Extrait de cœur de *Limnæa* après action de l'atropine. (Réduction de $\frac{1}{2}$).

L'action sur le cœur isolé de Grenouille est confirmative. On en voit l'effet inotrope et chronotrope négatif, l'arrêt, effet empêché par l'atropine. Nous en donnons des exemples dans les tracés reproduits ci-contre (fig. 9).

Bien mieux, le simple séjour de quelques cœurs d'*Helix* dans du Ringer ésériné pendant quelques heures permet de mettre en évidence dans ce liquide, le passage d'esters de la choline par diffusion, ainsi que nous l'avons signalé avec A. JULIEN, M. BOUCHET et Mlle VUILLET [187-48]. Cette simple expérience indi-

que déjà, de même que le fait de l'activité très forte des extraits ésérinés par simple broyage, qu'en grande partie l'acétylcholine paraît libre dans l'organe. Sur ces faits, nous aurons d'ailleurs à revenir plus longuement.

Du point de vue quantitatif, les résultats de nos dosages sont consignés dans le tableau suivant. Dix-neuf espèces terrestres et marines ont été étudiées par nous.

On en verra la répartition selon la classe et selon l'espèce (voir tableau p. 93).

Ce tableau est assez significatif. Les cœurs des Céphalopodes, des Lamellibranches, des Gastéropodes, Opisthobranches ont une teneur en acétylcholine inférieure à 1 γ par gramme.

Chez les Céphalopodes même (*Sepia*, *Octopus*), nous n'avons pu en déterminer le taux exact, nos extraits ayant été faits à trop faible concentration. La pauvreté du cœur d'*Octopus* avait déjà été signalée par BACQ [13] qui en estimait la teneur en A. C. $< 0,2$ γ par gramme.

Dans la classe des Gastéropodes, on note de grandes différences selon la sous-classe : pauvreté chez les Opisthobranches où d'ailleurs nous ne pouvons généraliser puisque nous n'en avons étudié que deux espèces d'*Aplysia*. Richesse relative chez les Pulmonés ou d'*Helix lucorum* (1 γ 3) et d'*Helix pomatia* (2-3 γ) la teneur en esters de la choline s'élève jusqu'à atteindre 5 et 7 γ chez *Limnæa stagnalis* et *Helix nemoralis*. Enfin nous insisterons sur la forte teneur rencontrée chez les Prosobranches où les taux remarquables, confirmés par de nombreux dosages, de 20 à 30 γ par gramme ont été

Tableau indiquant la répartition de l'Acétylcholine dans le myocarde des Mollusques.

Classe	Espèces	Teneur en acétylcholine (en γ de chl. d'A.C. par gr.)	
		Méthode rapide par broyage simple en Ringer éseriné	Méthode d'extraction trichloracétique selon Chang-Gaddum
Lamelibranches :	<i>Unio batavus</i>	0,2	
	<i>Anodonta cygnea</i>	0,3 - 0,4	
	<i>Mytilus galloprovincialis</i> ..	0,12	
	<i>Ostrea edulis</i>	0,7	0,5
	<i>Gryphaea angulata</i>	0,4	
	<i>Pecten Jacobæus</i>	0,2	
	<i>Venus verrucosa</i>		0,4
	<i>Pinna nobilis</i>	0,7	
Céphalopodes :	<i>Sepia officinalis</i>	<0,1	
Gastéropodes :	<i>Octopus vulgaris</i>	<0,1 (*)	
1) Opisthobranches	<i>Aplysia depilans</i>	0,2	
	<i>Aplysia fasciata</i>	0,1	
2) Pulmonés.	<i>Helix lucorum</i>	1,3	
	<i>Helix pomatia</i>	2,5 - 2,5 - 5 - 2,7 - 3	2,8 - 3 - 3,2
	<i>Helix nemoralis</i>	7,5	
	<i>Limnaea stagnalis</i>	5,3 - 5,5	6,1
3) Prosobranches.	<i>Cerithium vulgatum</i>	1,6	2
	<i>Murex brandaris</i>	21	18
	<i>Murex trunculus</i>	35 - 30 - 31 - 23 - 25	28

(*) Confirmatif des chiffres de BACQ.

décélés chez *Murex trunculus* et *Murex brandaris*. (On verra sur la fig. 10 des tracés de dosages se rapportant à quelques-unes de ces espèces).

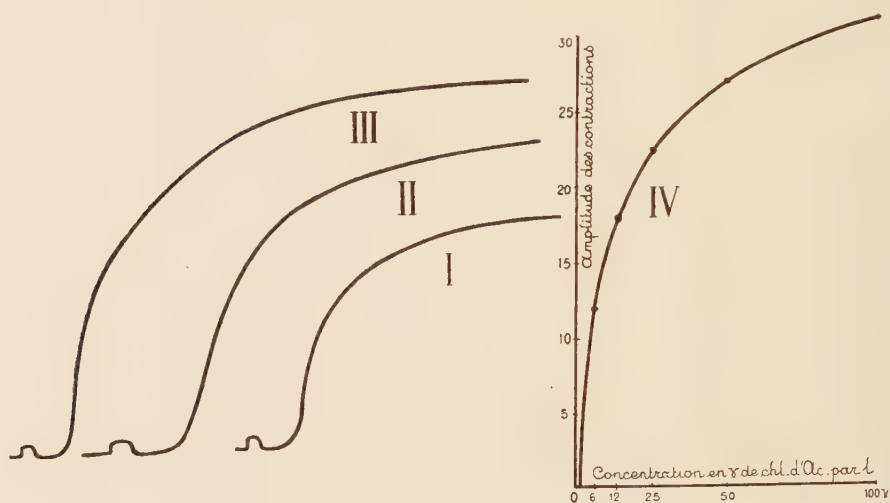


FIG. 10. — Action sur le muscle de Sangsue éseriné d'extraits trichloracétiques de myocarde de :

I. *Cerithium vulgatum* (0 gr. 085 dilué à 15 cc.).

II. *Murex brandaris* (0 gr. 480 dilué à 400 cc.).

III. *Murex trunculus* (0 gr. 600 dilué à 500 cc.).

IV. Courbe d'étalonnage du muscle réactif, ramenée à la même échelle que les tracés précédents.

(Réduit de moitié).

S'il existe de notables divergences selon les espèces, on constate une certaine unité de classe ; loin de nous cependant la pensée de formuler une loi générale, étant donné le nombre encore trop restreint d'espèces par nous étudiées dans chaque cadre. D'ailleurs la hiérarchisation des teneurs en A. C. ne semble pas suivre

exactement la classification zoologique, les Céphalopodes arrivant au bas de l'échelle et les Gastéropodes au sommet.

L'ACTIVITÉ CHOLINESTÉRASIQUE DU MYOCARDE ET DE L'HÉMOLYMPHE DES MOLLUSQUES

Parallèlement aux dosages que nous venons de rapporter, nous avons déterminé l'activité hydrolytique vis-à-vis de l'acétylcholine des extraits myocardiques et de l'hémolymphe des mêmes espèces. Dans le tableau suivant, nous avons consigné nos résultats obtenus par la méthode de titration ci-dessus décrite. Dans la plupart des cas, nous donnons deux chiffres, correspondant à la dernière dilution ne donnant aucune réaction et à la première dilution occasionnant une réponse nette de muscle de Sangsue. Entre les deux se situe la dilution limite indiquant le *pouvoir cholinestérasique* pour l'essai considéré (voir tableau p. 96).

RÉSULTATS

On voit que, soit qu'il s'agisse de l'hémolymphe, soit qu'il s'agisse du tissu myocardique, c'est chez les Lamellibranches qu'on trouve l'activité choline-estérasique la plus faible. L'hémolymphe, surtout chez certaines espèces est presque dépourvue d'action hydrolytique puisqu'il faut une dilution au 1/10 pour obtenir avec *Ostrea* et *Gryphaea* la destruction totale de l'activité d'une solution d'acétylcholine à 1/10⁷. Cette activité de l'hémolymphe varie considérablement selon les

Tableau indiquant l'activité cholinestérasique d'hémolymphes
et d'extraits myocardiques de Mollusques.

Classe	Espèces	Activité cholinestérasique de l'hémolymphes	Activité cholinestérasique du myocarde
Lamellibranches :			
	<i>Ostrea edulis</i>	10.....	500 à 1.000
	 <i>Mytilus variegatus</i>	10... ..	
	<i>Anodonta cygnea</i>	100.....	2.000
	<i>Mytilus galloprovincialis</i> ..	500 à 1.000	
	<i>Pinna nobilis</i>	500 à 1.000	
	<i>Unio batavus</i>	500 à 1.000	
	<i>Venus verrucosa</i>	>5.000.....	>2.500
Céphalopodes :			
	<i>Sepia officinalis</i>	1.000 à 2.000	>2.000
	<i>Octopus vulgaris</i>	1.000 à 5.000	
Gastéropodes :			
1) Opisthobranches			
	<i>Aplysia fasciata</i>	200 à 500	
	<i>Aplysia depilans</i>	>5.000.....	>2.000
2) Pulmonés.			
	<i>Helix nemoralis</i>	2.000 à 4.000	
	<i>Limnaea stagnalis</i>	5.000 à 10.000	2.000 à 5.000
	<i>Helix lucorum</i>	5.000 à 10.000	
	<i>Helix pomatia</i>	10.000 à 20.000	2.000 à 5.000
3) Prosobranches.			
	<i>Murex trunculus</i>	20.000 à 50.000	50.000
	<i>Murex brandaris</i>		20.000 à 50.000

espèces puisque de 10 chez *Ostrea*, elle se relève chez *Anodonta*, *Mytilus*, *Pinna*, *Unio* pour atteindre et dépasser même 5.000 chez *Venus*.

Chez les Céphalodes et les Gastéropodes Opisthobranches, l'activité cholinestérasique est assez intense.



FIG. 11. — Action sur le muscle de Sangsue éseriné de :

I. Solution témoin : chl. d'A. C. 1.10^{-7} , 37° , 24 heures.

II. Dilutions progressives d'hémolymphe de *Ostrea edulis* dans sol. de chl. d'A.C. 1.10^{-7} , contact à 37° , 24 heures.

(Taux de dilution indiqué sur le tracé). (Réduction de $\frac{1}{2}$).

Nous confirmons en ce sens les données trouvées par BACQ [13] chez *Octopus* et *Aplysia*. Chez les Pulmonés (*Limæa*, *Helix*), on note des chiffres semblables aux précédents pour le myocarde, mais nettement plus accusés pour l'hémolymphe dont l'activité dépasse 10.000 chez *Helix pomatia*. Enfin et surtout, parmi les Gastéropodes Prosobranches, *Murex* dépasse de beaucoup en activité les autres espèces : 20.000 à 50.000 pour l'hémolymphe et il en est de même pour l'extrait myocardique (fig. 11, 12 et 13).

En somme, myocarde et hémolymph sont en général à peu près d'activité de même ordre, mais les va-

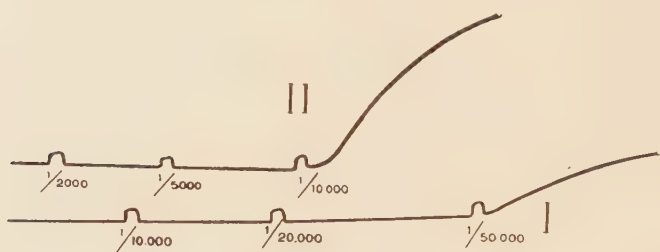


FIG. 12. — Action sur le muscle de Sangsue éseriné, de dilutions progressives :

I. De l'hémolymph de *Murex trunculus*.

II. De l'hémolymph de *Helix lucorum*.

dans sol. de chl. d'A.C. 1.10^{-7} , contact à 37° , 24 heures.

(Taux de dilution indiqué sur le tracé). (Réduction de $\frac{1}{2}$).

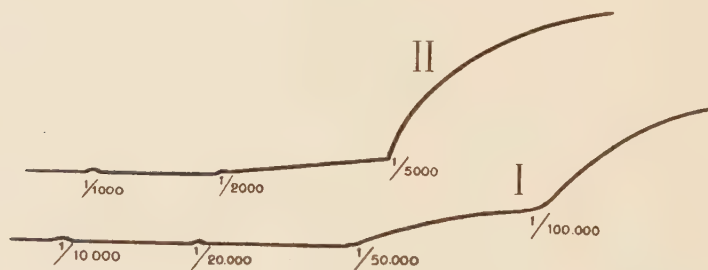


FIG. 13. — Action sur le muscle de Sangsue éseriné, de dilutions successives dans sol. chl. d'A.C. 1.10^{-7} , contact à 37° , 24 heures, de

I. Extrait myocardique de *Murex trunculus*.

II. Extrait myocardique de *Anodonta cygnea*.

(Taux de dilution indiqué sur le tracé). (Réduction de $\frac{1}{2}$).

riations, selon le groupe et l'espèce apparaissent surtout accusées dans l'hémolymph. Globalement l'activité croît des Lamellibranches aux Gastéropodes Pro-

sobranchees en passant par les Céphalopodes et les Gastéropodes Opisthobranchees et Pulmonés. Série ascendante dans l'activité cholinestérasique comme elle l'est, nous l'avons vu plus haut, dans la teneur du tissu myocardique en esters de la choline. Une exception est cependant à retenir : les Céphalopodes dont le tissu cardiaque est très pauvre en acétylcholine ont, dans leur hémolymphe et dans le cœur lui-même, une estérase d'une activité importante. Ces données confirment cette règle, rapportée par CHANG et GADDUM [69] et par GAUTRELET [142], que les organes riches en esters de la choline sont riches aussi en cholinestérase, que ceux pauvres en ces esters peuvent avoir cependant un pouvoir estérasique notable et parfois important, mais qu'il n'en existe pas comportant une forte teneur en esters de la choline et une activité choline-estérasique très faible ou nulle.

SUR L'ÉTAT DES ESTERS DE LA CHOLINE DANS LE CŒUR DE CERTAINS MOLLUSQUES

(*Helix pomatia* en particulier).

Helix pomatia dont la teneur du myocarde en « équivalent-acétylcholine » est relativement élevée (2-3 γ) nous a fourni un matériel commode pour l'étude plus systématique de l'état sous lequel existe l'ester de la choline dans ce tissu. La dose trouvée est-elle une réalité physiologique ou un « artefact » dû à une excitation

nerveuse intense lors des traumatismes du prélèvement ? Le principe actif existe-t-il dans l'organe à l'état libre et diffusible ? Si oui, comment expliquer sa co-existence avec une estérase, ferment qui l'hydrolyse avec une extrême facilité ? Telles sont les questions qui se posent après les constatations ci-dessus, questions auxquelles par quelques expériences, dans le cas particulier d'*Helix pomatia*, nous avons tâché de répondre, ou tout au moins d'y donner quelques arguments utiles, sinon décisifs.

I. — L' « Equivalent=Acétylcholine » constaté dans le cœur d'*Helix Pomatia* n'est-il pas dû à l'excitation nerveuse traumatique du prélèvement ?

Si l'on a constaté avec certitude la présence de cellules et même de véritables ganglions nerveux dans le cœur de *Murex* (MORIN et JULLIEN [261]) de même que d'autres auteurs l'ont vu chez différentes espèces de Gastéropodes Prosobranches et Opisthobranches. Le myocarde d'*Helix* fut, à ce sujet, l'objet de controverses. Les descriptions déjà anciennes de DOGIEL [97], POMPILIAN [281] furent controuvées et seule reste la constatation précise d'EIGER d'un ganglion à l'embouchure de la veine pulmonaire dans l'oreillette. H. CARDOT [66] en a fait une étude critique à laquelle on pourra se reporter pour plus de détails.

Pour éliminer, autant que faire se peut, toute intervention anormale des éléments nerveux qui pourraient à la suite des excitations parfois longues et répétées du

prélèvement, libérer de l'acétylcholine, nous avons fait une expérience à très basse température.

Des *Helix* séparés avec précaution de leur coquille, étaient plongés rapidement dans un vase isolant de type DEWAR, contenant de l'air liquide. La solidification était instantanée et les animaux étaient retirés après quelques minutes. Après un court séjour dans de l'eau, à température ordinaire, alors que l'animal était encore à 0° environ, on pratiquait aussi tôt que possible l'ablation du cœur qu'on mettait immédiatement en Ringer éseriné. Après pesée et broyage, on faisait le titrage biologique. Or, de tels essais nous ont donné des résultats absolument semblables à ceux faits sur le cœur prélevé normalement : 1 γ 8 à 2 γ 5 dans les deux cas. Il en fut de même dans un essai conduit parallèlement où les cœurs isolés normalement sur l'animal vivant avaient été ensuite plongés dans l'air liquide ; ce qui permet de rejeter en plus toute intervention directe du froid sur la dislocation d'un complexe ; une libération d'A.C. par le froid a été, en effet, constatée par GOLWITZER-MEIER sur la rate [151] et par E. CORTEGGIANI [77] sur le cerveau.

Il semble qu'on puisse éliminer toute action nerveuse anormale, puisque dans de telles conditions, la mort a dû être instantanée et les effets nerveux immédiatement suspendus. On peut donc conclure que l'acétylcholine dosée est bien sensiblement à une telle concentration dans le myocarde en fonctionnement normal.

II. — L'ester de la choline du cœur d'*Helix* est-il libre et diffusible ?

Diffusion de l'A. C. du cœur entier.

L'expérience que nous avons conduite avec M. Bouchet, A. Jullien et Mlle Vuillet [48-187] démontre à l'évidence l'existence d'une partie diffusible de l'acétylcholine, à travers le myocarde intact. Des cœurs baignant en Ringer ésériné confèrent à ce liquide une activité sur le muscle de Sangsue ; activité croissante en fonction du temps, et se stabilisant en moyenne au bout de 5 heures environ.

A ce moment, on peut calculer que 1/8 du stock d'acétylcholine cardiaque a diffusé dans le milieu extérieur. Le liquide (diffusat) a toutes les caractéristiques de l'acétylcholine sur le muscle dorsal de Sangsue de même que sur le cœur de Grenouille. Il est à remarquer que la diffusion est plus grande en présence de solution de concentration moléculaire globale nettement différente du milieu intérieur de l'animal ; elle augmente chez *Helix* lorsque le Ringer qui le baigne est 2 ou 4 fois plus concentré que le Ringer normal (0 γ 8 d'A. C. diffusée par gr. en 5 ou 6 heures au lieu de 0 γ 3 - 0 γ 4) ; même constatation fut faite en milieu très hypotonique (eau d'Evian).

Au contraire chez *Murex*, la quantité diffusée est plus importante (6 à 10 γ d'A. C. diffusée par gr. en 5-6 heures) dans le Ringer normal et dans l'eau d'Evian, que dans l'eau de mer (2 γ 5 seulement), qui est le milieu d'équilibre pour cet animal.

Ces faits expérimentaux s'expliquent fort bien par l'intervention des phénomènes osmotiques dus aux différences de concentration moléculaire des milieux, créant des échanges d'eau et d'ions et modifiant par des mécanismes plus complexes (gonflement ou rétraction des membranes) la perméabilité cellulaire. Mais le fait qui semble à retenir ici est que justement l'ester de la choline paraît diffuser à la façon d'une cristalloïde et selon les mêmes lois, du moins en première approximation.

Diffusion de l'A. C. du cœur après broyage.

Les phénomènes de diffusion précédemment démontrés se font naturellement avec une bien plus grande rapidité lorsque les organes ont préalablement été broyés. C'est ce que nous avons constaté déjà lors de nos dosages, lorsque nous avons vu que, du moins pour le cas du cœur d'*Helix*, le simple broyage en Ringer ésériné permettait de doser la même quantité d'A. C. que l'extraction trichloracétique.

L'expérience suivante de diffusion de cœurs broyés en milieu ésériné illustre bien cette diffusion rapide :

0 gr. 240 de cœurs d'*Helix* broyés dans 12 cc. de Ringer ésériné sont introduits dans un sac dialyseur préparé à l'aide de collodion (1) et mis à dialyser contre 25 cc. de Ringer ésériné. On abandonne à la température ordinaire et de temps en temps on prélève une

(1) Sacs de collodion très perméables préparés par moulage de collodion, (formule CALMETTE [61], mais sans emploi de la gélatine), dans de gros tubes à essais et conservés dans l'eau.

partie du liquide extérieur qu'on soumet au titrage biologique.

Après 2 heures 30' de contact, ce liquide extérieur a déjà une concentration de 12 γ ‰ de chlorure d'A. C.

Après 24 heures, la concentration n'a pas sensiblement varié : 13 γ ‰. Après ce temps, le liquide intérieur (extrait) a une teneur un peu plus faible que le liquide extérieur (10 γ ‰ environ).

On voit donc que, assez rapidement, l'équilibre est atteint et que cet équilibre s'établit en faveur du liquide extérieur, sans doute sous l'influence d'équilibres du type Donnan (1).

Un essai parallèle de diffusion sur une solution étalon d'acétylcholine nous a donné des résultats tout à fait semblables : dans des conditions à peu près identiques à l'expérience précédente, moins la présence de l'extrait, l'équilibre était à peu près réalisé après 2 heures 30' (14 γ ‰ alors que le chiffre théorique aurait été 15 γ ‰).

Les esters de la choline ainsi dosés dans le cœur d'Helix sont donc très facilement dialysables ; mais cela n'implique pas fatalement qu'ils soient primitivement libres au sein même du tissu, parce qu'ils peuvent être libérés facilement à partir de complexe très labile. Disons dès maintenant qu'il ne paraît pas s'agir ici de complexe du type de ceux étudiés par E. CORTEGGIANI [75-76-77], et dont l'acétylcholine qui y est liée est libérable par le chauffage à 70°. Dans des broyats de cœur d'Helix en Ringer ésériné, nous n'avons

(1) Peut-être y a-t-il eu aussi hydrolyse légère, à la longue, malgré l'ésérine.

observé aucune différence notable selon qu'ils avaient été ou non portés au B. M. à 70° pendant 3 minutes. Signalons que CORTEGGIANI [77] n'a pas davantage réussi à en démontrer la présence dans le cœur de Vertébrés.

Mais ne peut-il pas s'agir d'une libération de type diastasique analogue à celle démontrée par GAUTRELET et ses collaborateurs [143] dans le foie de Cobaye, ce phénomène d'autolyse du complexe devenant seulement complet au bout d'un temps plus ou moins long après broyage ? Nos essais faits en ce sens, ont montré que dans le cas particulier du cœur d'*Helix*, il ne paraît pas en être ainsi, ou que tout au moins cette libération se fait très rapidement, non plus en quelques heures, mais en quelques minutes, dès le broyage et qu'elle paraît complète dès le premier essai.

Si, en effet, on filtre immédiatement le produit de broyage de cœurs d'*Helix* en Ringer ésériné et qu'on titre au muscle de Sangsue le filtrat au début, puis après un certain temps (2-3 heures), on ne constate aucun enrichissement de ce dernier en fonction du temps. Par contre, lorsque la filtration s'est faite plus tardivement (1 heure), le filtrat est nettement plus riche que le filtrat immédiat (2 γ 5 contre 1 γ 8 dans notre expérience). Si l'on filtre après 2 heures ou plus, l'enrichissement n'augmente plus. Cela paraît peut-être dû seulement au fait de la diffusion moins rapide de l'acétylcholine à partir de parcelles grossières du tissu qui forcément restent incomplètement broyées. C'est pourquoi nous laissons toujours en contact le broyat avec le liquide qui le baigne pendant une heure environ avant

l'essai biologique. On ne peut cependant pas éliminer, d'après les faits précédents, toute intervention sur un complexe qui resterait non filtrable. En tout cas, si dans le cas qui nous occupe, complexe il y a, il s'agit certes d'un complexe d'une extraordinaire labilité.

III. — Comment l'Acétylcholine du myocarde d'*Helix* peut-elle coexister avec la Cholinestérase de cet organe ?

De quelle manière concevoir l'existence de quantités importantes d'esters de la choline dans des organes dont, nous l'avons vu, le pouvoir cholinestérasique est très intense ? CHANG et GADDUM, se posant la même question, indiquaient deux explications possibles :

— Ou bien l'existence d'un précurseur inactif de l'acétylcholine non attaquable par l'estérase.

— Ou bien la présence de l'ester de la choline à l'état libre, mais protégé de l'estérase, retenu par quelque structure spéciale qui, s'opposant à la diffusion, empêcherait son contact permanent et intime avec le ferment hydrolysant.

Le fait même que le simple broyage du tissu en milieu non éseriné amène avec une extrême facilité l'inactivation de l'acétylcholine qu'il contient évoque l'idée d'une séparation histologique de l'ester de la choline et de l'estérase dans l'organe intact. Sans doute, s'il en est ainsi, la cholinestérase qui est liée à une structure protéidique non diffusible, restera localisée mais l'acétylcholine dont la diffusibilité est grande viendra s'hydrolyser au contact de l'estérase en diffusant à l'entour de l'élément qui la contient.

Pour se rendre compte de ce fait, par un artifice évidemment très grossier et très éloigné de la réalité physiologique mais qui permet tout de même d'avoir une idée de la façon dont peuvent se passer ces processus, il est facile d'imaginer l'expérience suivante où acétylcholine et cholinestérase sont en contact à travers une membrane perméable à la première, mais non à la seconde.

Expérience de contact acétylcholine-cholinestérase à travers une membrane de collodion, en milieu non ésériné.

Dans un sac de collodion de 20 cc. de capacité environ, très mince et très perméable, préparé extemporanément comme il a été dit plus haut, et dont on a vérifié l'étanchéité aux molécules protéidiques, on introduit 10 cc. de sérum dilué au 1/10 en Ringer normal. Le sac est placé dans un petit vase à précipiter cylindrique dans lequel on introduit une solution de chlorure d'acétylcholine à 1/1000 en Ringer, en quantité suffisante pour égaliser les niveaux (20 cc.). On laisse dialyser à la température du laboratoire (18-20°) et après des temps assez longs, on prélève une petite partie des liquides extérieur et intérieur qu'on titre après dilution convenable au muscle de Sangsue ésériné. Nous avons employé une solution assez concentrée d'acétylcholine afin de pouvoir faire des titrages sur de très minimes prises d'essai ne modifiant pas les conditions hydrostatiques et pouvant être assez nombreuses sans perturber les échanges.

Le graphique ci-contre (fig. 14) représente la courbe de destruction de l'acétylcholine du liquide extérieur en fonction du temps. On a eu soin de vérifier à chaque essai que le liquide extérieur ne contenait pas d'albu-

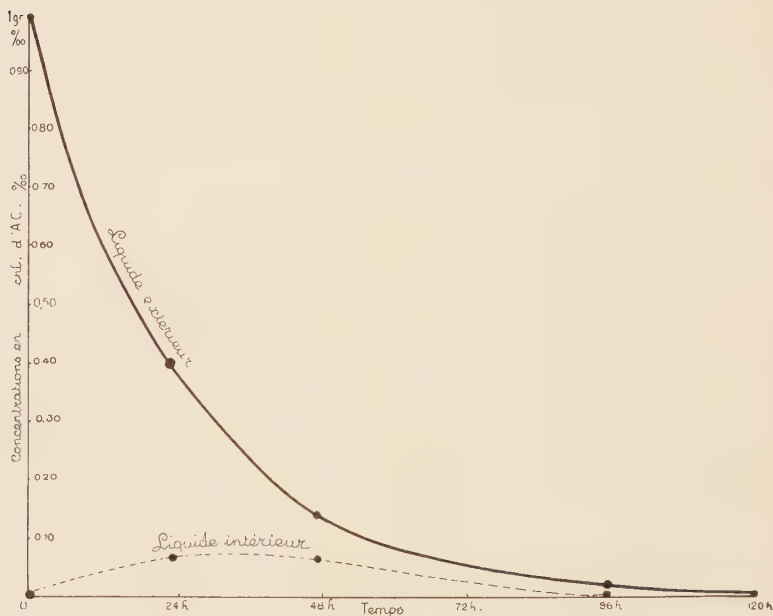


FIG. 14. — Courbe d'hydrolyse d'une solution de chlorure d'acétylcholine à 1/1000, en contact avec la cholinestérase (sérum dilué, liquide intérieur) à travers une membrane de collodion.

mine, donc pas de ferment, confirmant ainsi l'étanchéité de la membrane aux protéïdes et éliminant toute action directe de l'estérase sur l'acétylcholine du liquide extérieur. De plus, comme on le voit, le liquide intérieur, malgré la présence de la cholinestérase a une assez forte

concentration, s'enrichit quelque peu en acétylcholine venue du liquide extérieur. Une concentration d'équilibre s'établit à un niveau naturellement assez bas, tandis que la concentration dans le liquide extérieur s'abaisse de façon très régulière. Nous avons eu soin de vérifier que l'activité du liquide intérieur dilué n'était pas due à l'action de la choline libérée à l'hydrolyse ; en effet, l'hydrolyse alcaline de ce liquide lui faisait perdre tout ce qui lui restait d'activité, ceci prouvant que ce que nous dosions était bien l'acétylcholine non encore hydrolysée par le ferment.

Il apparaît donc qu'il s'établit un système d'échanges entre le liquide extérieur contenant l'acétylcholine et le liquide intérieur contenant la cholinestérase, par diffusion de la première vers la seconde. Cette diffusion, on le voit, est relativement lente à la température de l'expérience, et dans le milieu qui contient l'estérase un certain niveau de concentration en A. C. reste constant pendant un temps assez long.

D'autre part, nous avons pu nous rendre compte que ces phénomènes d'action diastasique se ramènent bien à une hydrolyse de l'ester en choline, car on peut aisément constater la production facile de cristaux de Florence par action de réactif iodo-ioduré sur des prises des liquides aussi bien extérieur qu'intérieur, après un certain temps d'expérience, ce qui prouve que la choline libérée elle-même repasse dans le milieu extérieur par un mouvement de retour.

Cette expérience évidemment ne répond pas à la réalité des faits : ni les concentrations réciproques d'acétylcholine et d'estérase, ni l'état même de la membrane ne

sont identiques à ce qui se passe dans l'intimité des tissus, ce sur quoi d'ailleurs nous n'avons à l'heure actuelle que bien peu de précision. Peut-être la diffusion se fait-elle moins bien ou mieux encore à travers les membranes des cellules, des synapses qui sont des membranes vivantes, et polarisées ?

L'expérience suivante montre d'un peu plus près ce qui se passe dans un organe intact, le cœur d'*Helix*, où nous laissons estérase et acétylcholine dans leur contact normal, pendant un temps assez long.

Conservation de la teneur en acétylcholine du cœur d'Helix, 24 heures après le prélèvement, malgré le maintien en milieu sans éserine.

10 à 20 cœurs d'*Helix*, prélevés et lavés sont baignés dans quelques cc. de Ringer *non éseriné* et laissés ainsi pendant 24 heures à la température ordinaire. Après ce temps on prélève le liquide qui les baigne et, l'ayant dilué dans une solution éserinée, on en fait l'essai et l'on voit qu'il n'a pas d'effet. Si alors on broie les organes en Ringer éseriné, on observe une très forte contraction, qui correspond au taux habituel trouvé dans le cœur d'*Helix* immédiatement après le prélèvement (2-3 γ).

D'abord, le liquide qui baigne les organes n'a pas gardé d'activité certainement parce que l'acétylcholine qui a dû diffuser (ainsi qu'on le constate facilement en milieu éseriné, nous l'avons montré plus haut) a été hydrolysée soit lors de sa diffusion à travers le myocarde lui-même, soit dans le liquide extérieur par de

l'estérase venant de traces d'hémolymphe restantes. Dans l'organe lui-même, la teneur en A. C. reste normale, malgré une certaine déperdition par diffusion, malgré la présence d'estérase active dans le muscle et cela plus de 24 heures après le prélèvement. Dans un cas, nous avons même constaté un enrichissement qui peut paraître paradoxal, de l'acétylcholine du myocarde dans ces conditions.

Ces éléments expérimentaux paraissent bien prouver que la destruction spontanée de l'acétylcholine ne se fait que dans de faibles proportions dans l'organe intact, même pendant assez longtemps après le prélèvement, ce qui suppose un contact non intime et total entre le ferment et le substrat qu'il attaque. Le ferment empêcherait surtout la diffusion à l'état actif de l'acétylcholine en dehors de l'élément (synapse par exemple) sur lequel elle agit. Cette diffusion qui existe certainement au sein de l'organe, puisqu'elle se fait même dans le milieu extérieur, reste sans doute assez limitée pour que le cœur, même restant inactif et séparé de l'organisme puisse reconstituer son stock normal. Il paraît nécessaire d'invoquer ici pour l'expliquer, la survie du cœur et la libération d'une nouvelle quantité d'acétylcholine à partir d'une « réserve » par un mécanisme encore bien obscur.

**ESSAI D'EXPLICATION
DE PARTICULARITÉS FONCTIONNELLES DU CŒUR
CHEZ CERTAINS MOLLUSQUES**

Les constatations précédentes de très grandes différences dans la teneur du myocarde de certaines espèces en acétylcholine et dans leur pouvoir cholinestérasique (en particulier chez *Murex*) ne peuvent-elles pas expliquer les anomalies fonctionnelles relevées par certains auteurs ? Nous prendrons pour base de discussion l'étude fonctionnelle du cœur de *Murex*, faite par G. MORIN et A. JULLIEN [260]. Leurs observations étaient, en résumé les suivantes : alors que les préparations de cœur des autres Mollusques convenablement montées et baignant dans un liquide adéquat (H. CARDOT et ses élèves [10-64-65] ont montré le rôle de premier plan joué par les électrolytes et la répartition des anions et des cations sur l'automatisme et la rythmicité), battent immédiatement, on assiste avec *Murex* le plus souvent à une inhibition d'assez longue durée. L'excitabilité du cœur est alors faible, mais après quelques heures, les excitations mécaniques portées déclenchent des séries de contractions de plus en plus longues et la contraction rythmique, automatique s'installe bientôt régulièrement. Si le cœur n'a pas eu de phase d'inhibition initiale, on constate une accélération progressive du rythme. L'explication plausible de ces faits pouvait être la libération d'acétylcholine lors du

prélèvement par l'excitation des formations neuro-ganglionnaires décrites par MORIN et JULLIEN [261], entraînant un effet d'arrêt de plus ou moins longue durée (JULLIEN). D'ailleurs, l'effet de l'atropine qui supprime cette inhibition et fait réapparaître rapidement les battements du cœur inerte après montage, est tout à fait favorable à cette idée, si l'on s'en rapporte à ce qu'on sait de l'antagonisme acétylcholine-atropine chez les Vertébrés. Mais expérimentalement, il n'en est pas de même chez *Murex*, où l'atropine ne lève pas l'arrêt provoqué par l'acétylcholine (HEYMANS, KRUTA, BACQ, JULLIEN et MORIN) ; chez les Invertébrés, comme il ressort des constatations de BACQ sur *Octopus* et *Eusepia*, GAUTRELET et HALPERN [145] sur *Helix*, le curare se comporte comme l'antagoniste de l'acétylcholine. A. JULLIEN l'a d'ailleurs constaté avec nous-même [183] très nettement chez *Murex*.

Du point de vue de son comportement à l'égard de l'excitant électrique, le cœur de *Murex* a fait l'objet de recherches de la part de A. JULLIEN et H. MARDUEL [180-181], comparativement avec celui de *Mytilus gallo-provincialis*. Leurs réactions sont assez différentes : alors qu'à la fermeture, leur réponse est semblable (accélération ou arrêt selon la polarité), à l'ouverture du circuit, quelle que soit la polarité de l'électrode large, des phénomènes d'inhibition se produisent ou simplement se prolongent chez *Murex* selon le cas, tandis que chez *Mytilus*, la pulsation reprend aussitôt normalement.

Le comportement dissemblable de ces deux organes, dont l'un est extraordinairement riche en « équivalent-

acétylcholine » et l'autre très pauvre, évoque naturellement l'idée de l'intervention active de ce facteur. Néanmoins, il serait souhaitable de pousser plus avant l'investigation chez d'autres espèces, et il paraît prématuré pour l'instant de tirer conclusion hâtive, en un domaine si complexe.

**MISE EN ÉVIDENCE
DE L'EFFET ACÉTYLCHOLINIQUE
DES EXTRAITS DE CŒUR DE MOLLUSQUES
SUR LE CŒUR ISOLÉ D'*HELIX POMATIA***

Cette complexité apparaît bien dans l'étude que nous avons faite avec A. JULLIEN, M. BOUCHET et Mlle VUILLET [190-191], de l'action des extraits et produits de diffusion de divers cœurs de Mollusques (de préférence les plus riches en « A. C.-équivalent ») sur le cœur isolé et pulsant d'*Helix pomatia*.

Cette préparation déjà utilisée par BIEDERMANN [37], LAPICQUE et CARDOT [220-63], L. BINET et PERLES [40], GAUTRELET et HALPERN [145] réagit à l'acétylcholine par un effet inotrope et chronotrope négatif ; mais l'arrêt se fait sur une ligne de tonus parfois plus rapprochée du tonus systolique normal que du tonus diastolique, ou même le dépassant. Nous avons vu que l'application de la drogue par perfusion interne permet d'obtenir des effets inotropes et chronotropes négatifs pour de bien plus faibles concentrations ($1/10^7$) que le contact par la voie externe ($1/5.10^5$). L'ésérine augmente considérablement sa sensibilité ($1/10^8$).

On retrouve très nettement cette action (arrêt avec élévation du tonus diastolique plus ou moins forte et reprise de l'automatisme sur un mode chronotrope et

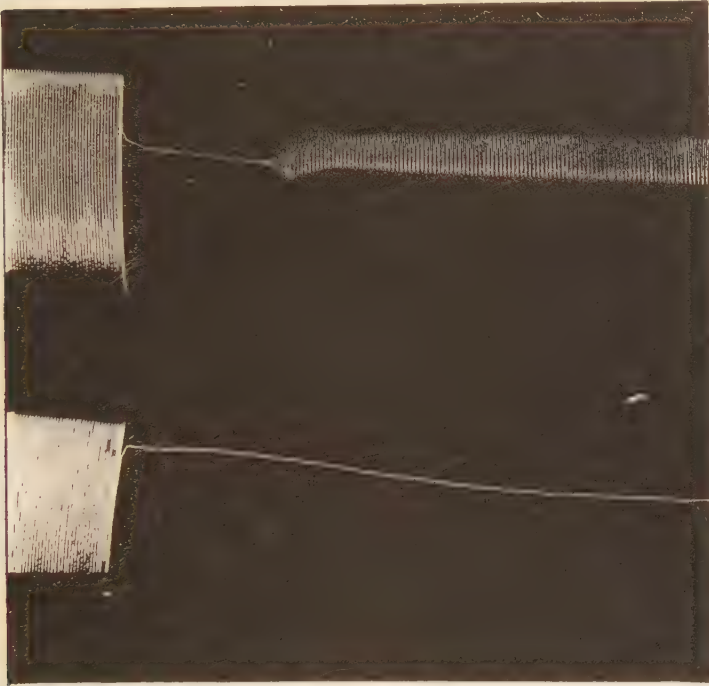


FIG. 15. — Action de solutions d'acétylcholine sur le cœur pulsant d'*Helix pomatia* (perfusion interne).

I. Chl. d'A. C. 1.10^{-8} en sol. ésérinée (tracé supérieur).

II. Chl. d'A. C. 1.10^{-7} en sol. ésérinée (tracé inférieur).

(Reproduction du Service photographique de l'Université).

inotrope négatif) avec les extraits de cœurs par broyage en milieu ésériné ou dans les diffusats spontanés des organes en Ringer (on verra des exemples dans les fig.

15 et 16, montrant l'effet de solutions d'acétylcholine d'une part, et d'un broyat et d'un diffusat de cœur d'*Helix* d'autre part.

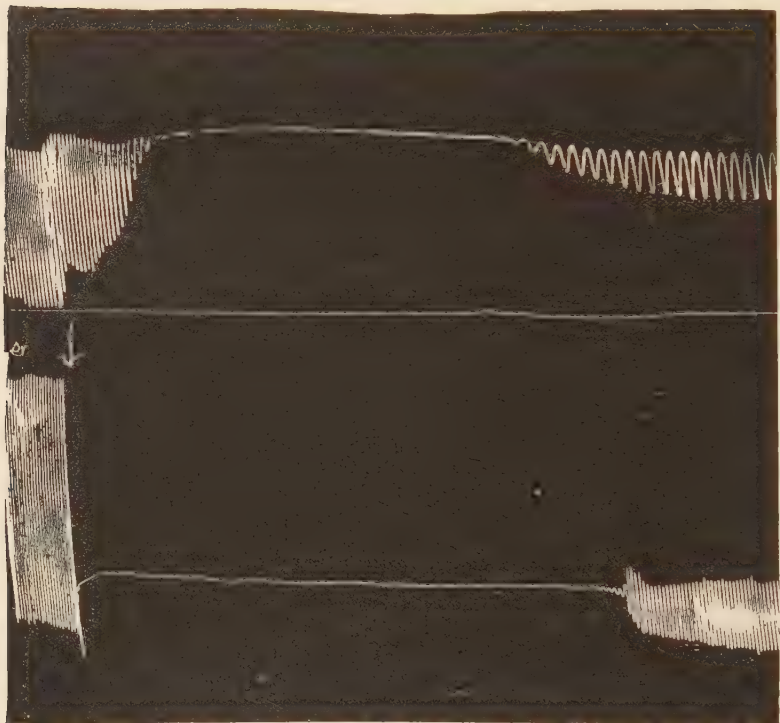


FIG. 16. — Action sur le cœur pulsant d'*Helix pomatia* de :
I. Produit de broyage de myocarde d'*Helix pomatia*, en milieu ésériné (tracé supérieur).
II. Produit de diffusion simple de cœurs d'*Helix pomatia* après 30 minutes, en milieu ésériné (tracé inférieur).
(Reproduction du Service photographique de l'Université).

Mais cette action n'est qu'une résultante de multiples facteurs auxquels le cœur d'*Helix* est très sensible : constituants minéraux, électrolytes dont H. CARDOT

[64-65-66], ARVANITAKI et CARDOT [10] ont montré toute l'importance, et substances organiques accompagnant les dérivés choliniques, probablement apparentées à l'adrénaline ou à la tyramine (BOTTAZZI a d'ailleurs caractérisé cette dernière dans les glandes salivaires des Mollusques). On reconnaît en effet dans l'action de diffusats en milieu ésériné des modalités réactionnelles qu'on provoque presque identiquement avec des mélanges : acétylcholine - adrénaline ou acétylcholine - tyramine. Nous n'insisterons pas davantage sur ces faits qui feront l'objet d'un mémoire prochain.

L'ACÉTYLCHOLINE DANS LES DIVERS ORGANÉS DE MUREX

Incité par la constatation précédemment rapportée de la richesse en « équivalent-acétylcholine » du cœur de *Murex*, nous avons voulu poursuivre plus loin nos investigations chez cet animal. Deux espèces : *Murex trunculus* et *Murex brandaris* ont servi à cette étude. Nous donnerons d'abord nos recherches sur l'animal entier, puis le détail de la répartition dans les principaux organes.

Animal entier.

Les extraits, soit obtenus par simple broyage en Ringer ésériné, soit par extraction trichloracétique, nous

révélèrent pour Murex, extrait « *in toto* », une teneur élevée en acétylcholine. Les chiffres obtenus par nous étaient les suivants (par gramme) :

10 γ $\tilde{5}$ en moyenne pour l'extrait ésériné :

11 à 12 γ en moyenne pour l'extrait trichloracétique.

Les essais classiques permettant de conclure qu'il s'agit d'ester de la choline furent confirmatifs : destruction de l'activité par le sérum et par NaOH—N ; cependant l'ésérine s'est montrée considérablement moins sensibilisante du muscle à ces extraits qu'à l'acétylcholine elle-même. Peut-être s'agissait-il d'un ester de la choline, facilement hydrolysable par le sérum et par la soude, mais moins activé par l'ésérine. Dans ce cas (nous y reviendrons d'ailleurs plus loin), les chiffres donnés (en chlorure d'acétylcholine) ne seraient que des chiffres minima.

Sur le cœur de Grenouille, nous avons observé l'inhibition de type vagal levée par l'atropine.

Principaux organes de Murex.

La richesse de l'animal entier en ester cholinique, ne pouvant venir uniquement de celle du myocarde étant donné le très faible poids de cet organe, il n'est pas douteux que d'autres organes doivent présenter eux aussi de forts « équivalents d'acétylcholine ».

Le tableau suivant donne les résultats de nos déterminations sur des extraits trichloracétiques des princi-

paux organes (en γ de chlorure d'acétylcholine par gramme) :

Pied 0,24

Bulbe 1,2

Glande œsophagienne 2,4

Hépatopancréas et glande génitale .. 1,6

Rein 6,2

Branchies et osphradium 7,3

Glande à pourpre 130 à 200

(chiffres confirmés par de multiples essais).

Si l'on fait le rapport de la quantité d'acétylcholine contenue dans chaque organe au poids total de l'animal entier, on trouve approximativement 10 à 12 γ par gramme, ce qui corrobore notre observation précédente sur l'animal entier. On voit que la répartition n'est pas homogène, mais qu'au milieu d'organes dont la teneur en « A. C. équivalent » est déjà très considérable, la presque totalité de la substance active est localisée dans la glande à pourpre, organe si particulier des *Murex*. Elle contient en effet sensiblement 80 % de l'« A. C. équivalent » de l'animal entier.

Nous avons naturellement localisé notre étude sur cet organe dont la forte teneur en esters de la choline était susceptible de nous fournir un objet pratique très intéressant.

Etude sur la glande à pourpre des « Murex ».

Identification du produit actif.

L'identification *biologique* d'abord, sur les extraits trichloracétiques obtenus à partir de glandes à pourpre prélevées immédiatement sur l'animal, a été faite par les moyens habituels. Les tracés reproduits ci-contre (fig. 17 et 18) montrent nettement : 1°) l'action de l'ex-

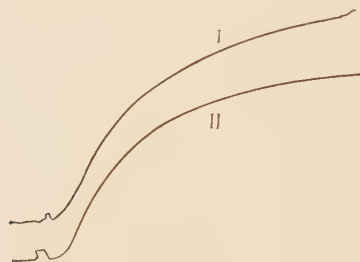


FIG. 17. — Contraction du muscle de Sangsue éseriné en présence de :

I. Extraît trichloracétique de glande à pourpre de *Murex* (0 gr. 80 de glande dilué à 7.500 cc.).

II. Solution-étalon de chl. d'A.C. $0,166 \cdot 10^{-7}$.
(Réduction des $\frac{2}{3}$).

trait très dilué sur le muscle de Sangsue éseriné, comparativement à une solution d'acétylcholine. 2°) La disparition de cet effet (courbes II et III, fig. 18) par action du sérum et par hydrolyse alcaline. Nous avons observé, d'autre part, l'effet inhibiteur sur la préparation de cœur de Grenouille. 3°) Enfin nous devons redire à propos des extraits de cette glande ce que nous notions à propos de ceux de l'animal entier : si l'accroissement

de l'effet sous l'influence de l'ésérine est très important, net et indubitable, il est considérablement moins grand que celui d'une solution de titre équivalent d'acétylcholine ; l'extrait donne déjà une certaine contraction du muscle non ésériné, alors que cette dernière ne provoque rien. On peut, d'après ces données, présumer

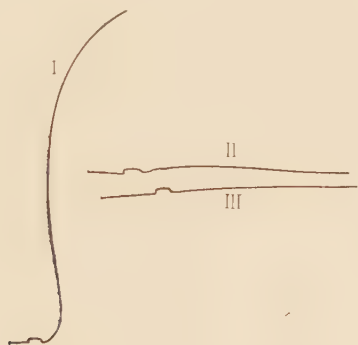


FIG. 18. — Action sur le muscle de Sangsue ésériné :

I. Extrait trichloracétique de glande à pourpre de *Murex* (0 gr. 80 de glande dilué à 2.000 cc.).

II. Extrait de même concentration après contact avec du sérum.

III. Extrait de même concentration après action de NaOH, N, à froid.

(Réduction des 2/3).

qu'on est en présence très vraisemblablement d'acétylcholine mélangée, soit à une quantité très forte de choline, soit à d'autres triméthylammoniums à fonction ester proportionnellement moins influencés ou même non touchés par la cholinestérase (acétyl - β méthylcholine ; carbaminoylcholine ou autres).

Par l'expérience suivante, on se rend compte qu'il paraît effectivement en être ainsi :

Si, en effet, on effectue sur le muscle ésériné de Sangsue, l'essai de l'extrait trichloracétique convenable-



FIG. 19. — Action sur le muscle de Sangsue ésériné de :

I. Solution de chl. d'A.C. $0,25.10^{-7}$.

II. Solution de chl. d'A.C. $0,5.10^{-7}$.

III. Extrait trichloracétique de glande à pourpre de *Murex* (correspondant à 0 gr. 005 de glande dilué dans 100 cc. de Ringer) après acétylation.

IV. Même extrait, même concentration, hydrolysé, puis acétylé.

(Réduction de $\frac{1}{2}$).

ment dilué d'abord tel quel, puis après acétylation, enfin après hydrolyse préalable et acétylation ultérieure, on voit que dans les deux derniers cas, la réponse du muscle est plus intense que dans le premier. Les courbes

rapportées (fig. 19) témoignent de ce fait. Il semble logique d'admettre que dans le premier essai, on a titré l'action totale d'esters de la choline plus ou moins actifs (acétylcholine surtout) ; dans le deuxième, l'effet précédent, augmenté de celui apporté par la choline primitivement non estérifiée, transformée en ester acétique par le chlorure d'acétyle ; dans le troisième, s'y ajoute encore l'effet des esters non primitivement acétylés, et qui, après hydrolyse, ont été transformés en acétylcholine par acétylation. Dans ce dernier cas, on obtient l'effet maximum, car tous les esters de la choline et la choline elle-même sont devenus acétylcholine.

Ce raisonnement qui paraît logique, et repose sur un fait expérimentalement bien net, explique assez bien, à notre sens, les particularités observées lors de la sensibilisation par l'ésérine.

Numériquement, nous nous contentons de donner les chiffres moyens assez approximatifs suivants (rapportés en γ de chlorure d'A.C. par gramme) :

Esters de la choline (essai direct) 130-200 ;

Esters de la choline + choline (acétylée) : 800-1300 ;

Esters de la choline (transformés en acétylcholine, après hydrolyse) + choline (acétylée) : 2500-3500.

Ce qui permet de conclure :

1°) à la présence de choline : 400 à 800 γ environ en chlorure de choline ;

2°) à l'existence probable d'un ester hydrolysable et transformable en acétylcholine par acétylation, dont l'activité propre serait approximativement

10 à 20 fois moindre que celle de l'acétylcholine, à moins qu'il ne s'agisse d'un dérivé absolument inactif à l'essai direct et devenant actif par acétylation après hydrolyse.

L'essai d'identification chimique fut ensuite tenté.

On sait que l'acétylcholine donne des dérivés relativement caractéristiques : chloroplatinates et chloroaurates qui permettent surtout de la distinguer des dérivés analogues de la choline. Partant d'un matériel qui nous paraissait riche en substances choliniques, nous avons tenté une identification par cette voie. Sans y avoir parfaitement réussi, nous donnerons cependant à titre documentaire nos résultats à ce sujet.

1° Il nous fut assez facile d'obtenir à partir d'extrait trichloracétique concentré de glandes à pourpre, hydrolysé par la soude concentrée, puis traité après acidification par le réactif iodo-ioduré de Florence les cristaux caractéristiques de périodure de choline se lysant au bout d'un moment. La micro-photographie ci-contre représente une de ces préparations (fig. 20). La spécificité de cette réaction de Florence, mise en doute par BLANCHETIÈRE, BOUGAULT, a été admise par KAHANE [192], au moins comme réaction-type de la « famille » de la choline.

De notre constatation, on ne peut donc que déduire qu'il existe des bases choliniques en assez grande abondance dans la glande à pourpre des *Murex*.

2° Pour pousser plus loin l'identification, nous avons eu recours aux chloroplatinates et chloroaurates, dans

les conditions suivantes, en appliquant la méthode de KAPPFHAMMER et BISCHOFF [211] d'après le mode opératoire utilisé par BACQ et MAZZA [22].

Les glandes à pourpre d'un lot de *Murex* étaient prélevées sur l'animal vivant et placées immédiatement dans de l'acide trichloracétique à 10 %. Les glandes (65 gr.) ainsi séparées furent ensuite hâchées, broyées

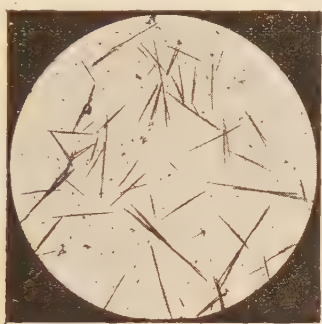


FIG. 20. — Microphotographie de cristaux de Florence obtenus à partir d'un extrait concentré de glande à pourpre de *Murex*, hydrolysé par NaOH.

(Service photographique de l'Université de Lyon).

finement et enfin exprimées à travers un linge. Les débris furent éliminés par centrifugation et lavage à la solution trichloracétique et le liquide fut filtré. Le filtrat, d'une belle coloration rouge violacée, fut alors traité à l'éther par agitation dans une grande ampoule à décantation, à 4 reprises. La phase étherée qui se colorait fortement en un beau rouge, fut éliminée, alors que la phase aqueuse qui restait acide devenait légèrement brune et opalescente. Après concentration, on obtint

environ 30 cc. d'un liquide assez fortement coloré en brun dont l'essai, à dilution convenable, au muscle de Sangsue montrait qu'il ne s'était pas produit de perte appréciable d'activité lors de l'extraction. L'extrait fut additionné d'une solution saturée (4 %) fraîchement préparée de sel de Reinecke (1), jusqu'à cessation du précipité. Ce précipité très abondant ne présentait au microscope qu'un aspect granuleux, amorphe avec quelques rares cristaux très peu caractéristiques. Après 12 heures de séjour à la glacière, il fut centrifugé, recueilli sur filtre, lavé à l'eau glacée, à l'alcool et à l'éther. Après dessiccation dans le vide, son poids était de 1 gr. 012. Il fut dissous ensuite dans 60 cc. d'un mélange p. e. d'acétone et d'eau, traité par $\text{SO}^4 \text{ Ag}$ à 6 % (60 cc.) jusqu'à cessation du précipité qui fut séparé par centrifugation. Après avoir ajouté 30 cc. de chlorure de Ba à 10, 25 % pour précipiter tout SO^4 , on filtra et le liquide clair obtenu fut mis à concentrer dans le vide.

L'addition de chlorure de Pt à ce liquide concentré, produisit aussitôt un précipité abondant de couleur jaune orangée qui, au microscope, présentait l'aspect cristallisé d'aiguilles courtes, assez larges en navettes formant des images radiées en corolle. Ces cristaux biréfringents fondaient vers $248^\circ\text{-}250^\circ$ (au tube capillaire) en se décomposant. Leur poids était de 0,181.

Le liquide obtenu après séparation du chloroplatinate fut additionné de quelques cc. de solution saturée d'acide picrique dont l'excès fut ensuite éliminé par agitation

(1) Nous sommes très reconnaissant aux Laboratoires HOFFMANN LA ROCHE qui nous ont très obligeamment fourni ce produit.

avec l'éther. Après concentration, l'addition de AuCl^3 (0 gr. 50 en solution concentrée) permet d'obtenir un précipité abondant jaune, de poids = 0 gr. 093. La purification de ce chloroaurate s'est révélée extrêmement difficile, car ce corps était presque totalement insoluble, même dans l'eau bouillante.

Nous nous sommes demandé si une partie du principe actif n'avait pas été précipitée à l'état de chloroplatinate ; pour cela nous en avons effectué la décomposition selon la technique préconisée par DUDLEY, par agitation avec de la poudre d'Ag (obtenue elle-même par double décomposition de $\text{SO}^4 \text{Fe}$ et de $\text{NO}^3 \text{Ag}$ en milieu acide) ; il se dépose AgCl et Pt tandis que la base (choline ou acétylcholine) passe en solution sans qu'il se produise d'hydrolyse. L'essai biologique de cette solution y décèle une forte activité du type acétylcholine disparaissant après action du sérum ou passage en milieu fortement alcalin. D'après cet essai quantitatif, nous avons vu que l'activité constatée ne correspondait étant donné le poids de chloroplatinate obtenu, qu'à une faible partie de celle qu'il aurait dû donner s'il s'était agi de chloroplatinate d'acétylcholine. Ou bien c'était un chloroplatinate très impur ou bien le chloroplatinate d'un autre ester cholinique.

Sur la solution obtenue, nous avons fait alors une précipitation par le chlorure d'Or. Nous avons obtenu, de même que précédemment un volumineux précipité jaune, de masses amorphes non biréfringentes extrêmement peu solubles dans l'eau bouillante. Nous avons cependant pu obtenir par purification après reprise dans l'eau bouillante des formes cristallines assez peu satis-

faisantes d'ailleurs, se déposant en branches ramifiées irrégulières. Leur trop faible quantité ne nous a malheureusement pas permis de tenter l'analyse élémentaire de ce produit dans d'assez bonnes conditions. Seul le point de fusion a pu être recherché : 160-162° en tube capillaire.

Que faut-il conclure de cet essai d'identification chimique ?

Notre étude ne nous permet pas, malheureusement, de réponse absolument péremptoire. Cependant, en plus des arguments d'ordre biologique ci-dessus exposés, il ne paraît pas douteux qu'on ait affaire à des dérivés choliniques parmi lesquels on trouve probablement à côté de choline libre, des esters choliniques de diverses sortes. Sans doute nous ne pensons pas pouvoir affirmer d'après nos essais d'identification que nous ayons isolé des chloroplatinate et chloroaurate d'acétylcholine. On peut cependant voir que la substance active, comme de multiples essais biologiques faits au cours de l'extraction le prouvent, donne un reïneckate, surtout un chloroplatinate de même qu'aussi un chloroaurate dont le point de fusion, à défaut d'autres caractéristiques, répond au dérivé de l'acétylcholine, ou d'esters qui s'en rapprochent. Le P. F. du chloroaurate (160-162°) permet d'éliminer l'intervention de la choline seule, puisque le chloroaurate de choline fond à température beaucoup plus élevée : 224 à 250° d'après SMORDINZEW ; 257° (REUTER) ; 267-270° (LEHMAN) ; 243-244 (DUDLEY). Il est voisin au contraire du P. F. observé pour le chloroaurate d'A. C. : 154°-155° (NOTHNAGEL) ; 168°-169° (JONES et MAJOR) ; 166°-168° (DUDLEY).

Le *chloroplatinate*, par son point de fusion (248° - 250°) correspond bien aux divers composés analogues obtenus à partir des esters de la choline : pour l'acétylcholine : 256° - 257° (EWINS) ; 244° (DUDLEY) ; 227° (JONES et MAJOR) ; 223 - 224° (NOTHNAGEL) ; pour le chloroplatinate de choline : 234 - 235° (GULEWITCH) ; et enfin 248° pour le chloroplatinate double de choline et d'acétylcholine isolé par DUDLEY. Vers 240° - 250° entrent en fusion et décomposition de très nombreux chloroplatinates doubles de choline et de ses divers esters (DUDLEY [100]), ainsi que des chloroplatinates simples d'esters de la choline. Peut-être est-ce parmi ces derniers qu'il faudrait rechercher la substance en cause ici ?

Enfin il nous semble qu'on puisse éliminer les dérivés chloroplatiniques et auriques de bases autres que la choline : neurine qui dérive de cette dernière par perte d'une molécule d'eau, surtout dans les processus de putréfaction, mais son chloroplatinate fond à 195° - 198° (GULEWITCH), 213° (MEYER et HOPFF) et son chloroaurate à 236° d'après GUGGENHEIM ; spermine dont le chloroaurate fond à 216° - 219° et le chloroplatinate à 242° - 245° (WREDE) ; di ou triméthylamine, muscarine et même putrescine et cadaverine dont l'action physiologique toxique sur l'appareil cardio-vasculaire ressemble souvent en gros, à celle de la choline et de ses esters, mais dont l'effet sur le muscle de Sangsue n'a pas encore été à notre connaissance expérimenté ; nous ne pouvons jusqu'à plus ample informé les retenir dans cette étude. De même nous nous sommes demandé s'il ne s'agirait pas d'un poison analogue à la substance que BACQ [20 bis] a mise en évidence chez les Vers Némertiens,

qui fait contracter le *rectus* de Grenouille et le muscle de Sangsue, mais dont l'effet n'est pas augmenté par l'ésérine, ni aboli par le sérum ou par le passage en milieu alcalin. Or, dans nos expériences, nous avons toujours vu très nettement ces actions.

En somme de cet ensemble de recherches, on peut, semble-t-il, conclure, en présence des arguments biologiques joints à certains arguments chimiques, moins nets, il est vrai, pour la probabilité sinon la certitude, de la présence de dérivés esters de la choline hydrolysables par le sérum et par la soude et recouvrant leur activité augmentée par acétylation ; ils donnent des chloroplatinates et des chloroaurates semblables, mais non identiques à ceux des esters de la choline. A vrai dire, les documents trouvés dans la littérature à leur sujet sont souvent trop imprécis, incomplets, parfois même contradictoires, pour qu'une conclusion formelle soit possible.

Du rôle des esters de la choline dans la glande à pourpre.

Et maintenant comment interpréter la présence d'une aussi grande abondance d'esters de la choline dans cet organe dont les fonctions sont encore très mal connues, mais dans lequel le système nerveux ne paraît pas, de prime abord, jouer de rôle particulièrement actif ?

Cette glande appelée « bandelette à pourpre », « glande à glaire » ou « glande hypobranchiale », représente, d'après F. BERNARD [31], un épaissement de la lame épithéliale recouvrant la face interne du manteau. GRYNFELDT [153-154] y décrit une partie « mé-

diale » et deux zones « marginales », contiguës respectivement à la branchie et au rectum. C'est la zone médiale qui produit la pourpre dont FRIEDLANDER [129], dès 1907-1909, établit la nature indigotique : 6-6' di-bromoindigo. DERRIEN [93] montra que le préchromogène de la pourpre n'est autre que l'indoxyle. Cependant, ce seraient surtout les zones marginales qui élaboreraient des produits indoliques décelés par LISON [230] à l'aide de réactions histochimiques et responsables selon lui de l'odeur infecte de cette glande. Notons que DERRIEN attribuait cette odeur à la présence de mercaptans, probablement parmi les termes inférieurs de la série.

N'insistons pas sur l'hypothèse de LETELLIER [226], que la pourpre, outre son but ornemental de colorant de la coquille était favorable à la reproduction. RAPHAËL DUBOIS [98] lui attribuait surtout un rôle de glande à venin ; il en étudia la toxicité. Son extrait alcoolique abandonnait un liquide huileux brun, plus toxique pour les animaux à sang froid que pour les animaux à sang chaud. Il en constata d'ailleurs les effets hypotenseurs chez le Chien, fait que nous rapprochons naturellement de la forte teneur en esters de la choline que nous y avons décelée. Ce venin aurait pour cet auteur une action défensive et même offensive pour la capture des proies. Pourtant P. H. FISCHER [120] n'admet que le rôle génital de cette glande.

En ce qui concerne le rôle possible des esters de la choline, il apparaît en l'occurrence assez mystérieux, du moins dans les proportions importantes où nous les avons trouvés. A côté du rôle de médiateur chimique de

l'influx nerveux qui, dans le cas particulier, ne paraît sans doute guère à retenir, il y a lieu d'envisager un rôle éventuel toxique (peut-être servent-ils à l'élaboration de dérivés toxiques à noyau cholinique, type muscarine, par exemple) ; peut-être ont-ils un rôle génital ou même un rôle antitoxique, comme l'hypothèse générale en a été formulée par BACQ [20], en 1937, au Congrès de l'Association des Physiologistes, autant d'hypothèses qui restent hasardeuses tant que de nouvelles recherches n'auront pas éclairé le rôle de cette curieuse glande.

CHAPITRE III

Recherches sur les esters de la choline et la cholinestérase chez les Crustacés

Nombreuses furent les recherches ayant trait à l'étude du système neuro-musculaire des Crustacés, dont les particularités importantes relevées par RICHET (1879) [285], BIEDERMANN (1898) [37], HOFFMANN [168], puis PANTIN [274] et KATZ [212], BAIN [23], JASPER [175], plus récemment, faisaient suggérer l'existence des modalités spéciales d'action au niveau de la jonction myo-neurale dans cette classe. D'ailleurs, étudiant le premier chez eux, l'acétylcholine, BACQ en 1935 [13], en relevait la très faible teneur (et même l'inexistence) en même temps qu'il constatait l'absence d'activité cholinestérique de leurs tissus et humeurs, ainsi que l'insensibilité de ces animaux (*Lepas anatifera*, *Carcinus maenas*, *Palinurus vulg.*) à l'injection de grosses quantités d'acétylcholine. qu'il retrouvait éliminées bientôt

telles quelles, non hydrolysées, dans l'eau qui les baignait [15]. Il semblait néanmoins difficile d'admettre chez les Crustacés, qui possèdent indubitablement des nerfs inhibiteurs vrais, l'inexistence d'une médiation chimique. Un peu plus tard, dans des recherches plus précises, BACQ (1937) [16] observait un pouvoir cholinestérasique important des muscles de Crustacés marins, et avec NACHMANSOHN [269] démontrait l'activité cholinestérasique du muscle chez *Homarus vulg.*, tandis que MARNAY et NACHMANSOHN [247] observaient sur le nerf abdominal du même animal un très intense pouvoir cholinestérasique (20 fois plus actif que le nerf myélinisé de Grenouille). Dans le sang des Crustacés cependant, la recherche de la cholinestérase restait négative ; SIMONART [293], dès 1931, signalait son absence dans le sang du Homard ; BACQ [16], récemment, ne parvenait pas à en déceler l'activité dans le sang des Crustacés marins, et KOCHITOJANZ [215] n'en trouvait pas davantage dans le sang de l'Ecrevisse. Parallèlement, l'insensibilité des préparations neuro-musculaires des Crustacés à l'acétylcholine était elle-même en partie controuvée : FESSARD [119] et BACQ obtenaient sur le nerf de *Carcinus maenas*, la preuve électrophysiologique de son excitation par l'acétylcholine, et KATZ [212] observait que des solutions de 1/500 à 1/10.000 d'acétylcholine étaient capables de provoquer des contractions par l'excitation du nerf ; mais BACQ [16], avec KATZ [212] et DU BUY [59] d'estimer que le nerf seul est sensible à l'acétylcholine, mais non la fibre musculaire elle-même.

Quant à la teneur des organes de Crustacés en esters de la choline, très peu de documents ont été donnés jus-

qu'à présent. BACQ [13] n'en signalait que des traces discutables dans des extraits totaux ou musculaires de *Maïa*, *Peneus caramote*, *Palinurus vulgaris* et *Lepas anatifera*. Cependant, étudiant en particulier le système nerveux, CORTEGGIANI [77] (1938) en décelait des quantités extrêmement fortes : 4 à 8 γ par gramme chez *Maïa squinado*, 15 à 20 γ chez *Cancer Pagurus* et jusqu'à 75 γ chez *Astacus fluvialilis*. L'acétylcholine s'y comportait comme libre et non bloquée sous forme de complexe thermolabile.

Nos recherches personnelles ont porté parallèlement sur la teneur en esters de la choline et sur le pouvoir cholinestérasique de quelques tissus de Crustacés.

I. — Teneur en esters de la Choline.

Nous avons opéré dans ces recherches sur les extraits trichloracétiques exclusivement, par la méthode plus haut décrite. La plupart de nos déterminations portèrent sur *Astacus fluvialilis* chez qui nous avons étudié la plupart des organes. Chez les Crustacés marins, nous n'apportons de documents personnels que pour le système nerveux et le myocarde de *Palinurus*, *Carcinus maenas* et *Maïa squinado*.

Système nerveux.

Il existe incontestablement d'importantes quantités d'esters de la choline dans le système nerveux des Crustacés. Nous avons pu en déceler plus de 20 γ par gramme dans la chaîne nerveuse et les ganglions cérébroïdes d'*Astacus fluvialilis* ; mais on constate de grandes dif-

férences selon les essais. Dans certains cas, nous n'obtenions que 3 à 5 γ . Chez *Palinurus* la richesse est moindre (3 - 4 γ) ; il ne paraît pas exister de différences importantes entre les ganglions cérébroïdes et le reste de la chaîne ; une quantité analogue est décelée chez *Carcinus* et elle nous a paru assez faible quoique nous n'ayions pu la déterminer avec précision chez *Maia*.

Ces chiffres, quoique moins élevés, confirment dans l'ensemble ceux donnés par E. CORTEGGIANI [77].

Autres organes.

Le cœur de l'Ecrevisse s'est montré relativement riche en esters de la choline (0 γ 4 à 1 γ 2), mais les extraits faits à partir du cœur de Langouste, *Carcinus*, *Maia*, avaient une activité bien moindre. D'ailleurs, pour le myocarde, comme pour presque tous les extraits assez concentrés d'organes (sauf le système nerveux), de Crustacés, nous avons observé un effet inhibiteur marqué, rendant difficile et illusoire une interprétation quantitative dans ces cas. Ce fait a auparavant été signalé chez ces mêmes espèces par BACQ [13] et par CORTEGGIANI [77].

II. — Activité cholinestérasique.

En plus des organes ci-dessus étudiés, nous avons recherché et déterminé le pouvoir cholinestérasique de l'hémolymph chez *Astacus fluviatilis*.

Contrairement aux observations de BACQ [16] (qui se rapportent d'ailleurs aux Crustacés marins) et de KOCIROJANZ [215] qui a étudié le sang d'*Astacus*, nous avons démontré l'existence d'une activité cholinestérasique

certaine du sang chez l'Ecrevisse, ainsi que le montre le tracé ci-contre (fig. 21) : le coagulum légèrement bleuté du sang était broyé au mortier, réparti à la dilution 1/5 dans une solution d'A. C. à 1.10^{-7} , à $\text{pH} = 7$.

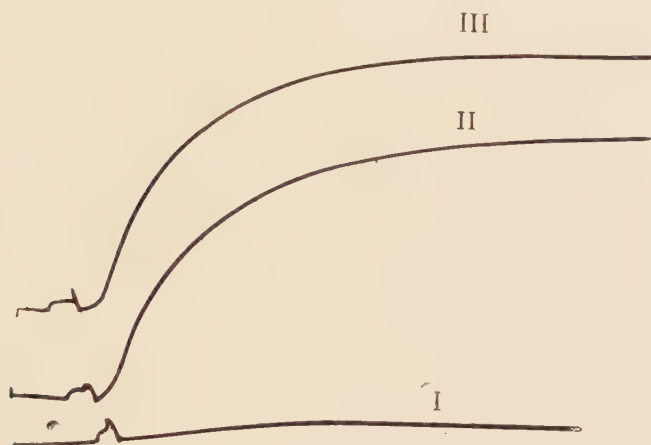


FIG. 21. — Activité cholinestérasique du sang d'*Astacus fluviatilis*. (1 cc. de sang + 5 cc. Ringer A.C. 1.10^{-7} , contact pendant 4 heures à 37° , puis dilution à 10 cc. pour l'essai biologique.

Action sur le muscle de Sangsue ésériné :

I. Sang dans les conditions ci-dessus.

II. Sang préalablement chauffé à $70-80^{\circ}$, pendant 5 minutes.

III. Contact en milieu ésériné.

(Réduction de 1/3).

et laissé en contact 4 heures à 37° . La figure 21 représente les réponses du muscle de Sangsue ésériné à trois essais faits parallèlement : l'un avec l'hémolymphe telle quelle, l'autre avec l'hémolymphe préalablement chauffée à $70^{\circ}-80^{\circ}$ pendant 5 minutes, l'autre enfin effectué

en milieu ésériné. Il existe donc dans le sang d'Ecrevisse un ferment hydrolysant l'A. C., détruit par le chauffage et inhibé par l'ésérine.

Quantitativement, ce pouvoir cholinestérasique de l'hémolymphe reste assez faible : 40 à 100, sur de nombreux essais, suivant la technique décrite plus haut.

Les extraits d'organes d'Ecrevisse nous ont permis de constater une activité estérasique beaucoup plus intense dans certains : de 300 pour le muscle, le tube digestif, à 1.000 pour le cœur et atteignant 6 à 8.000 pour la chaîne nerveuse. Parallélisme relatif entre teneur en ester cholinique et activité estérasique analogue à celui déjà constaté chez les Mollusques.

Chez les Crustacés marins, ce pouvoir estérasique s'est révélé aussi intense dans le système nerveux (1.500 chez *Carcinus* à 8.000 chez *Palinurus*), de même l'extrait cardiaque présentait aussi une activité du même ordre (700 à 800) chez ces mêmes espèces que chez *Astacus*

CHAPITRE IV

Recherches sur la répartition de l'acétylcholine et de la cholinestérase chez les Vertébrés et sur leur mode d'action biologique

Dans ce chapitre, nous apportons :

1° Nos résultats de détermination de l' « A. C. - équivalent » dans les organes du Cobaye.

2° Nos recherches par dosages de choline et d'acétylcholine sur la destinée de l'acétylcholine injectée à l'animal.

3° Nos essais d'inactivation de la cholinestérase *in vivo* chez le Cobaye.

4° Nos déterminations d'acétylcholine et d'activité cholinestérasique dans quelques organes humains.

**I. — L' « ÉQUIVALENT-ACÉTYLCHOLINE »
DES ORGANES DU COBAYE**

En vue de recherches ultérieures qui seront consignées plus loin sur la fixation d'acétylcholine dans les tissus, nous avons dû préalablement faire les déterminations d'acétylcholine des principaux organes du Cobaye. En général, nous avons opéré sur les extraits trichloracétiques d'organes prélevés immédiatement, dès l'animal sacrifié. On trouvera sur le tableau suivant (p. 148) les quantités d' « A. C. - équivalent » trouvées chez le Cobaye normal ainsi que chez l'animal ayant reçu par voie sous-cutanée de fortes doses d'acétylcholine. A noter que les chiffres qui y sont consignés se rapportent à un animal témoin seulement et ne sont, par conséquent, pas une moyenne. Donnons-en ici succinctement une impression plus juste résultant de la moyenne des nombreux dosages que nous avons pratiqués chez le Cobaye.

Les plus importantes teneurs d' « A. C. - équivalent » ont été trouvées dans l'intestin grêle (de 1 γ 6 à 3 γ par gr.), la surrénale (0 γ 6 à 1 γ), le cerveau 0 γ 5 à 0 γ 8), la moëlle (0 γ 4 à 0 γ 7), le pancréas (0 γ 2 à 0 γ 6), le cœur (0 γ 2 à 0 γ 5) ; les oreillettes sont apparues légèrement plus riches que les ventricules, et nous confirmons, avec moins d'écart cependant, les données de ENGELHARDT [109] chez le Lapin. Enfin se situent les organes les plus pauvres en esters de la choline : le poumon (0 γ 1 à 0 γ 2), le foie (0 à 0 γ 2 dans deux détermi-

nalions), la rate (0 à 0 γ 2), le rein (0 à 0 γ 3), le muscle strié squelettique (0 à 0 γ 1). Le sang ne nous a révélé après extraction trichloracétique qu'une extrêmement faible activité, très inconstante d'ailleurs et toujours évaluée $< 0 \gamma 03$ par cc.

Les glandes salivaires, dont la teneur relativement élevée a été signalée, n'ont pas fait l'objet de recherches de notre part.

Ces résultats corroborent en général les données classiques de CHANG et GADDUM [69] qui expérimentaient sur d'autres espèces et les recherches récentes de E. CORTEGGIANI [77] sur le Cobaye.

II. — DONNÉES EXPÉRIMENTALES SUR LA DESTINÉE DE L'ACÉTYLCHOLINE INJECTÉE DANS L'ORGANISME

Choline et acétylcholine dans les tissus et humeurs de Cobaye après injection de grandes quantités de chlorure d'acétylcholine.

Il nous a paru intéressant d'étudier le sort de fortes quantités d'acétylcholine injectées à l'animal par voie sous-cutanée. Naturellement l'ester de la choline ainsi injecté doit être immédiatement hydrolysé par la cholinestérase. Néanmoins une petite partie ne pourrait-elle pas s'accumuler à l'état d'acétylcholine même dans certains organes avec prédilection ? Ou bien la choline formée ne se fixe-t-elle pas dans les tissus, également ou inégalement selon les organes, ou subit-elle dans l'éco-

nomie des transformations métaboliques ne permettant pas de la retrouver fixée en nature ? Telles sont les possibilités qu'on peut envisager concernant la destinée de l'acétylcholine injectée à l'animal.

Assez peu de travaux ont été faits sur cette question particulière. A part l'indication donnée par KEIL et PÖRTNER (Biochem. Zeitschr. 1935, 280, 61) dans une note se rapportant d'ailleurs à un autre objet, que l'injection d'acétylcholine à hautes doses chez le Rat ne permet pas de la retrouver dans le foie et la rate, tous les travaux, à notre connaissance, d'ailleurs déjà anciens, concernant les injections de choline à l'animal. BÖHM [45] (cité par GUGGENHEIM [155]) avait déjà constaté depuis longtemps que la choline injectée disparaît assez vite de la circulation. KINOSHITA (1910) [214] détermina la teneur en choline de nombreux tissus animaux, et ELLINGER [106], le premier, paraît avoir recherché le sort de la choline injectée par voie intraveineuse, sous-cutanée ou donnée « *per os* »; mais il employait une méthode par précipitation au chlorure de Pt, peu spécifique et assez douteuse. GUGGENHEIM et LÖFFLER (1916) [156] utilisant une méthode très sensible, préconisée par REID HUNT [171] et consistant en la transformation de la choline par acétylation et le dosage de l'acétylcholine formée par test biologique sur l'intestin de Cobaye, ne décelèrent aucune accumulation de la choline en nature dans les différents organes et confirmèrent la disparition assez rapide de tout excès de choline dans le sang. Au dire des mêmes auteurs, on ne noterait qu'une élévation passagère du taux de choline du sang et de l'urine après injection intraveineuse, et il

conviendrait d'admettre une transformation de la choline dans l'économie. Par ailleurs, PAGE et SCHMIDT [273] (1930) étudièrent l'activité destructive du sérum vis-à-vis de la choline et lui attribuèrent un mécanisme enzymatique. Récemment, MANN et QUASTEL [241] (1937) ont montré le pouvoir destructeur de coupes de foie de Rat, *in vitro*, sur la choline, qu'ils ramenaient à un processus oxydatif de nature fermentaire. Le dérivé d'oxydation ne serait autre que la bétaine-aldéhyde. F. et M. BERNHEIM [32] avaient déjà remarqué en 1933 l'oxydation de l'acétylcholine dans les tissus.

EXPERIMENTATION PERSONNELLE

Nous avons, pour nos expériences personnelles utilisé les techniques suivantes :

— Dosage des esters de la choline sur l'extrait trichloracétique des organes, traité selon la méthode de CHANG et GADDUM [69], décrite ci-dessus, et détermination de l'« équivalent-acétylcholine » au muscle de Sangsue éseriné.

— Dosage de la choline par acétylation et détermination de l'acétylcholine formée par le même procédé que plus haut.

Dosage de la choline par acétylation.

(*en partie d'après GUGGENHEIM et LÖFFLER [156]*).

Un petit fragment d'organe de poids connu (0 gr. 1 à 1 gr.) ou une quantité semblable de sang ou d'urine, est

reçu dans 5 à 10 cc. d'acide trichloracétique à 10 %. Après broyage minutieux on filtre et on rince le filtre avec un peu de solution trichloracétique. Le filtrat débarrassé de la plus grande partie d'acide trichloracétique en excès par plusieurs agitations avec de l'éther dans une ampoule à décantation à 3 ou 4 reprises est concentré dans le vide. Le résidu est introduit dans un tube à essais avec une quantité aussi minime que possible d'eau. On dessèche alors en s'aidant du vide. On étire le tube à la flamme et on y introduit avec précaution 1 à 2 cc. de chlorure d'acétyle ; on scelle avec soin l'ampoule qui, enveloppée d'un linge, est portée au B. M. bouillant et maintenue à 100° pendant 1 heure. Après refroidissement, on l'ouvre et on chasse le chlorure d'acétyle. Le résidu est repris par 10 cc. de Ringer. Cette solution est ensuite convenablement diluée en Ringer ésériné. On vérifie son pH et on neutralise si elle reste acide (dilution habituellement employée de 1/1000 à 1/20.000, au total, selon l'organe et sa richesse en choline). On fait l'essai biologique au muscle de Sangsue en comparant avec l'effet de solutions-étalons de chlorure d'acétyl-choline.

Il est alors facile de calculer la quantité de chlorure d'acétylcholine (A. C.) contenue dans l'organe analysé et d'en déduire la concentration cherchée en chlorure de choline (C.).

$$C = A. C. \times 0,76$$

Pour l'essai de cette technique nous avons opéré l'acétylation d'une quantité connue de chlorure de choline (100 γ) que nous avons retrouvée au dosage biologique à l'état de chlorure d'acétylcholine avec moins de 10 %

d'erreur. Il va sans dire que par cette méthode nous ne dosons que la « choline libre hydrosoluble ». Il faut d'ailleurs tenir compte des réserves exprimées récemment par KAHANE [196] sur l'existence d'esters facilement hydrolysables ou de complexes extrêmement labiles (1).

Marche des expériences.

Pour cette expérimentation, nous nous sommes adressé au Cobaye. Les organes d'un témoin, prélevés immédiatement après la mort, dans l'acide trichloracétique à 10 %, servirent aux dosages de l'acétylcholine et de la choline par acétylation.

D'autres animaux furent soumis à des injections sous-cutanées de chlorure d'A. C. (ampoules d' « Acécoline » LEMATTE et BOINOT à 0 gr. 05, 0 gr. 10 et 0 gr. 20 par cc.).

Le Cobaye B pesant 500 grammes reçut en 4 jours, en injections biquotidiennes 0 gr. 65 de chlorure d'acétylcholine : 0,05 le premier jour ; 0,10 + 0,10 le troisième jour ; 0,20 + 0,20 le quatrième jour. L'animal fut sacrifié 24 heures après la dernière injection et ses organes prélevés aussitôt. A noter que la veille de sa mort, il avait reçu l'énorme dose de 0 gr. 40 de chlorure d'A. C. Nous y avons adjoint 0 mgr. 1 d'atropine afin d'empêcher les effets toxiques possibles dûs à l'irruption accidentelle d'A. C. dans une veine au cours d l'injection.

(1) Pour ces questions, nous renvoyons le lecteur à la Conférence très documentée de E. KAHANE, sur « La Choline en Biochimie », *Bull. Soc. Chimie biol.*, 1937, 49, 205.

En effet l'animal A (480 gr.) qui avait reçu, en 7 jours, 0 gr. 95 de chlorure d'A. C. en injections quotidiennes, mourut environ 20 à 30' après la dernière injection. Il présenta des soubresauts musculaires, de l'agitation et de la polypnée, puis une paralysie du train postérieur. Les organes furent prélevés 1 heure et demie seulement après la mort.

Normalement après injection sous-cutanée de 0 gr. 10 ou 0 gr. 20 de chlorure d'A. C., on n'observait que de l'hypersecrétion nasale et de la polypnée pendant les 5 minutes qui suivaient l'injection et cela même après atropine. Souvent l'animal n'avait absolument aucun trouble apparent.

Résultats.

Les résultats numériques sont consignés dans le tableau ci-dessous (p. 148).

I. *Cobaye normal.*

Nous n'insisterons pas sur les chiffres d'« équivalent-A. C. » des organes du Cobaye normal, puisqu'ils ne sont dans cette expérimentation que confirmatifs des données déjà présentées plus haut.

Pour les taux de choline trouvés, ils se rapprochent beaucoup de ceux donnés dans les quelques travaux parus dans la littérature sur ce sujet (KINOSHITA [214], HUNT [171], GUGGENHEIM et LÖFFLER [156], GAUTRELET [142]. Nous donnons, en partie rapportées par J. GAUTRELET et par GUGGENHEIM les données numériques calculées, en γ de choline par gr. de tissu :

Foie (Bœuf) : 70 (SMCRODINZEW) ; 100 (KINOSHITA).

Pancréas (Bœuf) : 150 (KINOSHITA).

Intestin (Bœuf) : 600 (VON FÜRTH UND SCHWARTZ).

Intestin (Cheval) : 30 (KINOSHITA).

Surrénale (Bœuf) (*médullaire*) : 50.

— — — (*corticale*) : 170 (FELDBERG et SCHILD).

Rein (Bœuf) : 270.

Poumon (Bœuf) : 160 (KINOSHITA).

Rate : 120.

Sérum (Bœuf) : 2 à 20 (HUNT, GUGGENHEIM et LÖFFLER).

Sang (Chien) : 18 à 32 (selon le niveau)

MAXIM et VASILU).

Sérum (Chien) : 10 à 20 (VIALE).

Sérum de la veine surrénale : (Chien) 25 à 30 (VIALE).

Urine : 2 à 10 (GUGGENHEIM et LÖFFLER).

II. Cobayes ayant reçu des injections de chlorure d'A. C.

Si l'on examine les données de l'analyse des organes des cobayes des expériences A et B, on peut se rendre compte de la destinée de l'acétylcholine injectée. Dans les organes du cobaye A, mort peu de temps après une injection de 0 gr. 20 de chlor. d'A. C., on trouve une élévation importante de la teneur des organes en choline, et seulement une augmentation très minime de celle en A. C. Il est vrai que dans ce cas le prélèvement des organes n'a été fait qu'une heure et demie après la mort et que le taux probablement plus important d'A. C. au moment de la mort a dû être réduit par action de l'estérase pendant ce temps. Il paraît persister cependant une assez nette augmentation de l'A. C. dans les

centres nerveux (cerveau et moëlle). Mais la choline est retrouvée dans tous les tissus à une concentration à peu

TABLEAU indiquant les résultats de dosages d'Acétylcholine et de choline chez un Cobaye normal et chez deux autres ayant reçu de fortes doses d'A . C. en injections sous-cutanées.

Organes	Cobaye normal		Cobaye A ayant reçu 0 gr. 95 de chl. d'A.C. sous- cutanée, en 7 jours ; mort 20 à 30' après la dernière injection.		Cobaye B ayant reçu 0 gr. 65 de chl. d'A.C. sous- cutanée, en 4 jours ; sacrifié 24 h. après la dernière injection.	
	A.C. (en γ de chl. d'A.C. par gr.)	Choline (en γ chl. de choline par gr.)	A.C.	Choline	A.C.	Choline
Cerveau	0,6	123	1,4	350	0,6	100
Moëlle	0,5	121	1,4	460	0,9	95
Intestin grêle..	1,9	94	2	357	2,7	68
Surrénale	0,8	294	0,9	1376	0,5	285
Rein	<0,1	110	<0,1	386	<0,2	114
Foie	<0,1	115	<0,1	334	<0,2	114
Rate	<0,4	126	<0,6	281	<0,5	90
Pancréas	0,3	163	0,6	1064	0,3	115
Poumon	0,1	136	0,6	411	<0,1	140
Cœur	<0,4	80	<0,4	383	0,2	75
Muscle psoas..	<0,1	45	<0,2	337	<0,2	34
Sang total ...	<0,03	28	<0,03	110	<0,04	30
Urine					<0,01	380 (1)

près semblable. En moyenne, dans chaque organe, le taux de choline est augmenté de 300 γ par gr. environ ; nous avons vérifié par d'autres dosages que des organes

(1) Urine recueillie à partir de la dernière injection d'A.C. pendant 20 heures, sur 10 cc. d'acide trichloracétique à 10 %.

prélevés seulement deux heures après la mort, ne présentent pas d'enrichissement net de leur teneur en choline ; et si l'on calcule qu'il s'agit d'un animal de 500 gr. on en conclut que les 0 gr. 20 de chlorure d'A. C. de la dernière injection se retrouvent intégralement à l'état de choline a peu près également répartis dans tous les tissus. Seuls la surrénale et le pancréas présentent une concentration en choline qui dépasse largement celle rencontrée dans les autres organes. La choline n'aurait-elle pas une affinité élective pour eux et ne joueraient-ils pas un rôle particulièrement actif dans son métabolisme ? Pour ce qui concerne la surrénale, en effet, VIALE [311] a montré le rôle important de cette glande dans le métabolisme de la choline ; la veine surrénale contiendrait un sang notablement plus riche en choline, et d'après BIANCO une fonction de la corticosurrénale serait de décomposer et de synthétiser des lipides phosphorés selon les besoins de l'organisme. Peut-être dans le cas qui nous intéresse ici fixe-t-elle électivement et momentanément la choline plus que les autres tissus soit pour la détruire, soit pour synthétiser des lécithines. Seul le sang présente une augmentation bien moindre de sa teneur en choline. D'ailleurs PAGE et SCHMIDT [273], n'ont-ils pas montré la propriété du sérum de détruire la choline ajoutée, par un mécanisme fermentaire ?

Mais cet aspect, cette charge anormale en choline de tout l'organisme ne sont que passagers. L'examen de la teneur des tissus du cobaye B en choline montre que 24 heures après la fin d'une série importante d'injections de chlorure d'A.C. on ne retrouve aucune augmen-

lation de la richesse des organes en acétylcholine ni même en choline. Les teneurs trouvées sont même légèrement inférieures à celles de l'animal normal témoin. Seule l'urine renferme une quantité très élevée de choline. L'élimination ne s'est-elle pas faite tout simplement par le rein ? A noter que l'urine avait été recueillie à partir de la dernière injection de 0 gr. 20 de chlor. d'A. C. et maintenue fortement acide par un excès d'acide trichloracétique. Malgré cela, on ne retrouve pas de quantité décelable d'acétylcholine, mais 380 γ de choline par cc. Le volume d'urine émis dans les 24 h. ayant été de 20 cc., c'est à peine 7 à 8 mgr. environ de chlorure de choline qui ont été éliminés, soit à peu près 5 % seulement de l'acétylcholine introduite dans la dernière injection à elle seule.

Le reste a été transformé dans l'organisme ; selon GUGGENHEIM, il est soit fixé par transformation en léci-thines (manière de voir qui n'aurait pu être confirmée par SASAKI), soit plutôt désintégré par oxydation. Divers auteurs ont pensé qu'il se formerait des bétaines (MANN et QUASTEL [241], ce qui d'après KAHANE [196] est peu probable. Il apparaît plutôt que la molécule se scinde en triméthylamine d'une part qui s'éliminerait en nature ou qui, par déméthylation partielle ou complète et oxydation, formerait de l'acide formique (HOESSLIN [166], FRANCHINI [124]), et de l'urée ; d'autre part, la chaîne latérale donnerait un dérivé de type glycol éliminé à l'état d'acides oxalique ou glyoxylique, ou même selon POLLER (1933), à l'état d'éthanol. Ajoutons enfin que, selon RIESSER [286-287], la choline donnée à des Lapins provoquerait une élévation de la teneur du muscle en

créatine, cette dernière pouvant, au dire de cet auteur, dériver de la choline par déméthylation partielle en présence d'urée, avec comme intermédiaire probable la sarcosine. Plusieurs auteurs (SCHARPE, SCHANKS, BAUMAN, HINS et MARKER) paraissent avoir confirmé cette hypothèse.

Conclusions.

Les injections sous-cutanées répétées de grandes quantités de chlorure d'acétylcholine (0 gr. 65 à 0 gr. 95 en quelques jours pour un animal de 500 gr.) ne provoquent aucune accumulation durable, aucune surcharge des organes en acétylcholine ou en choline persistant 24 heures après l'injection.

Passagèrement, peu après l'injection, on trouve une imprégnation diffuse de tout l'organisme en choline, imprégnation à peu près égale dans tous les organes, avec cependant une prédilection particulière pour la surrénale et le pancréas.

L'élimination de la choline ainsi introduite dans l'organisme se fait en partie seulement dans l'urine à l'état de choline. La fraction ainsi éliminée ne paraît pas dépasser 10 %. Le reste est soit fixé sous forme insoluble, lécithines ou complexes, soit plutôt transformé par des processus oxydatifs.

III. — ESSAIS D'INACTIVATION DE LA CHOLINESTÉRASE « IN VIVO » CHEZ LE COBAYE PAR L'ÉSÉRINE

Recherche de l'Acétylcholine libre dans le sang.

Plusieurs travaux ont eu pour but de déceler l'apparition de l'acétylcholine immédiatement dosable dans le sang circulant, surtout après travail musculaire intense. L. FRANEL [127] notamment, en 1935, ne put constater d'effet acétylcholinique chez le Lapin que dans un cas isolé et peu démonstratif après contraction musculaire prolongée chez l'animal ésériné, et dans un cas sur l'animal simplement ésériné. Ces recherches reprises par FLEISCH, SIBUL et KEILIN [122], aboutirent au résultat suivant : les propriétés vaso-dilatatrices du sang veineux provenant du muscle au travail ne sont pas dues à l'acétylcholine (FLEISCH [121], puis STUDER et WEGER [303] ont d'ailleurs tenté de définir cette substance dilatatrice). Mais si la pression sanguine s'abaisse et si l'état circulatoire devient mauvais, l'acétylcholine, ou quelque substance analogue, peut apparaître. BLUM [44], d'autre part, a constaté l'apparition, dans le sang de l'animal ésériné, d'une substance contractant le muscle de Sangsue, dans 7 % seulement des cas, lors de la contraction musculaire prolongée.

D'un autre côté, rappelons que GAYET et MINZ [148-149] ont reconnu la présence d'acétylcholine dans le sang de la veine pancréatico-duodénale après excitation

du splanchnique et après injection d'ergotamine chez le Chien ésériné ; dans ce dernier cas, un mécanisme autre que l'inhibition de la cholinestérase par l'ergotamine (LOEWI et NAVRATIL) paraît être mis en cause.

Notre but dans les expériences qui vont suivre fut de voir si, à la faveur de l'injection de quantités variables d'ésérine, à une concentration telle qu'elle puisse inhiber assez complètement la cholinestérase, on peut voir apparaître dans le sang circulant une quantité appréciable d'acétylcholine immédiatement dosable. De plus, nous nous sommes proposé de voir en même temps par des dosages d'acétylcholine dans le sang quel est le taux de cette substance trouvé après injection sous-cutanée massive de ce produit chez l'animal intact et chez l'animal ésériné, ainsi que chez ce dernier, de rechercher la valeur de la concentration atteinte dans le sang au moment de la mort.

Essai de détermination d'acétylcholine libre dans le sang chez le Cobaye, après injection d'ésérine.

Les déterminations étaient faites sur le sang ponctionné au cœur ou obtenu par saignée, et reçu dans un tube contenant 2 cc. de Ringer ésériné. Après centrifugation, le plasma était essayé au muscle de Sangsue ésériné.

Les *doses moyennes* furent d'abord expérimentées.

L'injection de 1 mgr. d'ésérine par kilog. avec adjonction d'atropine (0 mgr. 5 par kilog) n'a pas été mortelle. Au décours d'une période d'agitation intense, la prise

de sang au cœur, 1 h. 10 après l'injection. ne révélait pas d'activité du plasma dilué au 1/3, sur le muscle de Sangsue éseriné ; ce qui correspondrait à A. C. $< 10 \gamma$ % de plasma. A noter qu'après la ponction sanguine, l'animal était redevenu calme, et que plusieurs jours après, il était encore en vie.

Les doses *plus fortes* au contraire (4 à 5 mgr. et plus par kilog.) de façon à obtenir une concentration corporelle à 1/200.000^e, concentration habituellement employée pour une bonne inhibition de la cholinestérase, avec ou sans addition d'atropine, entraînaient régulièrement la mort de l'animal en 30 à 60 minutes environ, parfois plus : soubresauts musculaires, agitation, polypnée, paralysie du train postérieur constituaient le cortège symptomatique jusqu'à la mort après une période d'agitation extrême. Il s'ajoutait sans doute, à l'effet anticholinestérasique une action toxique propre de l'éserine à de telles doses (1). L'atropine n'empêchait pas ces manifestations, mais paraissait les retarder.

L'essai du sang prélevé soit avant la mort, soit immédiatement après, nous a donné le plus souvent une action légère, mais nette, sur le muscle de Sangsue, qui paraît vraisemblablement due à la diffusion d'acétylcholine dans le sang circulant. Il est à noter que, dans certains cas, l'expérience fut négative ; mais dans ces cas, il s'agissait de préparations peu sensibles de muscle de Sangsue.

(1) SCHWEITZER et WRIGHT ont en effet bien distingué dans les effets de l'éserine sur le système nerveux central l'action anticholinestérasique (inhibition passagère de la réflexivité, analogue à ce que produit l'A. C.) et l'action « strychnique » excitatrice, non abolie par l'atropine.

Quantitativement, les teneurs suivantes furent trouvées (en γ de chl. d'A.C. par litre de plasma) : 14 γ ; 18 γ ; 20 γ ; 21 γ ; 36 γ ; enfin 70 à 120 γ ‰ dans un cas où la mort avait été plus tardive et où, par suite, l'acétylcholine avait peut-être pu diffuser plus largement.

Ces quantités sont nettement plus élevées que celles que nous avons trouvées sur le sang normal du Cobaye prélevé par ponction cardiaque sur ésérine (0 ; <10 γ), soit au moment de la mort traumatique de l'animal : 8 γ ; 6 γ ; 10 γ ; <20 γ ... Dans ce cas, on peut en effet constater, mais de façon irrégulière, une activité sur le muscle de Sangsue probablement liée, comme le pense FLEISCH, à une irruption d'A.C. dans le sang au moment du déséquilibre circulatoire terminal. Un fait à remarquer, bien que nous n'ayions pu encore le confirmer,, c'est qu'après extraction trichloracétique, la différence observée entre la teneur du plasma de l'animal ésériné et celle de l'animal normal tend à s'estomper, comme si l'inhibition cholinestérasique avait eu pour effet d'augmenter la proportion d'acétylcholine immédiatement dosable par rapport à l'acétylcholine masquée du sang. Interprétation que nous donnons naturellement sous toutes réserves. D'autre part, le plasma utilisé était le plus souvent légèrement hémolysé, et nous avons pu constater par un essai sur du sang de Bœuf que les hématies contiennent une assez forte proportion de substance active sur le muscle de Sangsue (de l'ordre de 40 γ ‰) à peu près équivalente à celle du sang total par extraction trichloracétique. Notons que GOLLWITZER-MEIER avait remarqué la prédominance acétylcholinique dans les globules.

Dosages de l'acétylcholine dans le sang après injection sous-cutanée, chez l'animal normal et chez l'animal éseriné.

Ainsi que nous l'avons déjà montré plus haut, l'injection d'acétylcholine par voie sous-cutanée au Cobaye

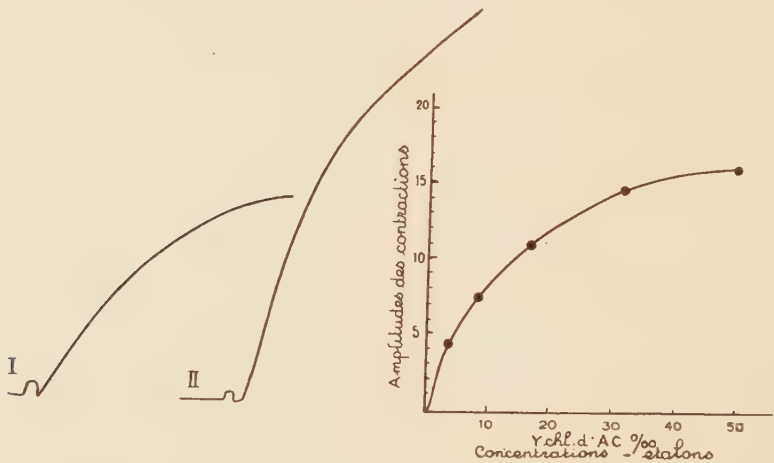


FIG. 22. — Action sur le muscle de Sangsue éseriné du plasma sanguin de Cobaye intoxiqué par l'éserine.

I. Animal ayant reçu trois milligrammes d'éserine par kilog. Prélevé après 55 minutes et dilué au 1/4 en Ringer éseriné.

II. Animal éseriné (1 milligramme par kilog), ayant reçu ensuite 0 gr. 01 de chlorure d'acétylcholine par voie sous-cutanée. Sang prélevé au moment de la mort, 5 minutes après la 2^e injection. Plasma dilué à 1/4 en Ringer éseriné.

A droite, graphique de contraction étalon, ramené à la même échelle.

(Réduit à 1/2).

normal, n'entraîne aucune augmentation durable de cette substance dans le sang. Mais ces dosages avaient été faits sur des prélèvements pratiqués assez longtemps

après l'injection. D'autres essais, faits sur prélèvement du sang par ponction cardiaque 30 minutes après l'in-

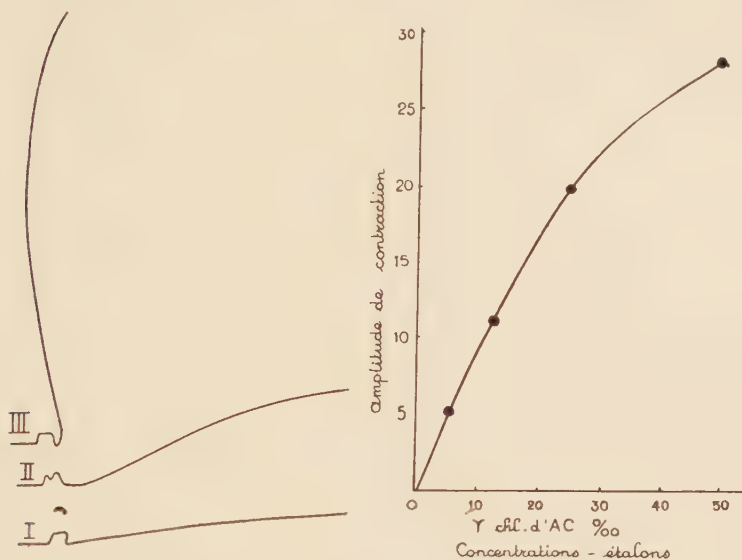


FIG. 23. — Action sur le muscle de Sangsue éseriné de :

I. Plasma de Cobaye normal, prélevé immédiatement après la mort (mort traumatique) et dilué au 1/3 en Ringer éseriné.

II. Plasma de Cobaye ayant reçu par voie sous-cutanée 0 gr. 005 d'éserine par kilog, prélevé au moment de la mort (25 minutes après l'injection) et dilué à 1/3 en Ringer éseriné.

III. Plasma de Cobaye ayant reçu 0 gr. 005 d'éserine par kilog + 0,025 de chlorure d'acétylcholine, par voie sous-cutanée. Prélèvement au moment de la mort (3 minutes après l'injection d'acétylcholine) et dilué au 1/4 en Ringer éseriné.

A droite, graphique de contraction étalon du muscle en expérience, ramené à la même échelle.

(Réduit de $\frac{1}{2}$).

jection de 0 gr. 025 de ch. d'A.C., ne révélèrent pas d'activité acétylcholinique appréciable ($<30 \gamma$ par litre). D'ailleurs, les animaux supportaient remarquablement

bien l'injection de doses plus grandes (0 gr. 20 pour un Cobaye de 500 gr.), sans incidents, à part le cas signalé plus haut.

Au contraire, l'injection d'acétylcholine à l'animal ayant préalablement reçu 1 à 2 mgr. d'ésérine par kilog. entraînait la mort presque instantanée : toujours en moins de 4 à 5 minutes, souvent dans la minute même, l'animal s'abattait foudroyé. La quantité d'acétylcholine trouvée dans le sang était alors toujours très importante : 200 γ ; 628 γ ; 700 γ ; 1480 γ ; et même dans un cas 3.000 γ par litre (dans ce dernier cas, la quantité d'ésérine injectée avait été plus faible, et ses effets toxiques propres étant moindres, la diffusion de l'acétylcholine avait pu sans doute mieux se faire). (fig. 22, II).

En résumé : Nous avons, de façon inconstante, mais assez fréquente, observé une action contracturante légère sur le muscle de Sangsue, du plasma de Cobaye intoxiqué par l'ésérine. Si dans certains cas, on peut admettre l'explication de FLEISCH sur l'apparition d'acétylcholine lorsqu'un fort déséquilibre circulatoire s'établit, nous avons pu mettre en évidence le fait d'une différence assez nette en faveur de l'animal ésériné par rapport à l'animal normal témoin.

D'autre part, fait depuis longtemps connu des physiologistes, l'injection d'ésérine même à doses assez faibles rend mortelle instantanément l'injection d'acétylcholine. Une véritable incompatibilité physiologique est indubitable entre ces deux substances. Nous donnons quelques indications quantitatives de la teneur en acétylcholine trouvée dans le sang au moment de la mort provoquée par leur action combinée.

D'autres recherches sont en cours concernant la possibilité d'augmentation du taux d'A.C. du sang compatible avec la vie chez l'animal plus faiblement et chroniquement traité par l'ésérine.

IV. — DÉTERMINATION DE L' « ÉQUIVALENT- ACÉTYLCHOLINE » ET DE L'ACTIVITÉ CHOLINES- TÉRASIQUE DANS QUELQUES ORGANES DU SYSTÈME NERVEUX HUMAIN

Trop rares sont les documents donnant la teneur en acétylcholine des organes humains. Il importe, en effet, lorsqu'on veut faire des recherches précises dans ce domaine, de n'opérer que sur des fragments d'organes prélevés par biopsie pour éviter toute action de lyse cadavérique sur les esters de la choline qu'ils contiennent. Nous avons mis à profit les possibilités pratiques que nous donnait notre situation hospitalière pour établir de ce point de vue la répartition de l'acétylcholine dans quelques tissus humains, nous attachant ici plus spécialement à l'étude d'éléments du système nerveux, et apportant seulement quelques documents assez épars qui, lorsqu'ils seront plus nombreux, feront l'objet d'une étude ultérieure plus complète.

Nous sommes très reconnaissant à MM. les Professeurs agrégés J. DECHAUME et P. WERTHEIMER, de même qu'à leurs collaborateurs du service de Neuro-Chirurgie de M. le Doyen LÉPINE à l'Hôpital E. Herriot, pour leur

obligeance à nous procurer le matériel opératoire nécessaire à cette étude.

Les fragments d'organes étaient recueillis dès l'ablation soit en Ringer ésériné, soit dans l'acide trichloracétique à 10 % ; souvent, l'extraction était faite parallèlement par les deux procédés. Le dosage était pratiqué au muscle de Sangsue. Pour la mesure de l'activité cholinestérasique, le fragment prélevé était placé dans de la solution de Ringer non ésérinée, et la détermination faite par dilution dans les conditions exposées plus haut.

Ganglions sympathiques.

A notre connaissance, aucune détermination d'A.C. n'a été faite dans les ganglions sympathiques humains. Nous apportons les résultats de 8 examens de ganglions : deux stellaires et six lombaires, prélevés opératoirement pour des cas cliniques divers (D^r WERTHEIMER). Le plus souvent, il s'agissait de ganglions apparemment sains dont l'exérèse était faite à titre palliatif (sympathectomie lombaire dans les syndrômes de moignon douloureux après amputation, par exemple). Dans d'autres cas, ils appartenaient à des malades atteints d'*angor* ou d'artérite.

En moyenne, la teneur en esters de la choline (en γ de chl. d'A. C. par gramme) fut trouvée comprise entre 1 γ 3 et 2 γ 1.

Dans deux cas cependant, elle était nettement plus élevée : 4 γ 3 dans un ganglion lombaire enlevé pour une artérite juvénile, et 5 à 6 γ dans un ganglion stellaire,

d'ailleurs anormalement volumineux, chez un malade atteint de syndrome angineux avec gros cœur.

Pour tous nos autres cas, les chiffres trouvés se rapprochaient donc beaucoup de ceux donnés par CHANG et GADDUM [69] pour les ganglions sympathiques du Cheval (1 γ 3 à 3 γ 9).

Nous ne discuterons pas ici de la signification possible des doses élevées révélées dans les deux cas assez particuliers déjà signalés.

L'activité cholinestérasique mesurée dans un cas s'est montrée assez intense (1500, selon notre notation). BRÜCKE [55] avait déjà (1937) signalé l'existence d'une quantité importante de cholinestérase dans le ganglion cervical du Chat.

Système nerveux central.

Au cours des interventions chirurgicales sur l'encéphale, notamment lors d'énucléations de tumeurs cérébrales, nous avons pu nous procurer en même temps que des éléments de ces tumeurs, des fragments de cerveau humain normal, prélevé dans les meilleures conditions requises pour l'analyse biologique.

C'est ainsi que dans un prélèvement de substance cérébrale des hémisphères, nous n'avons décelé qu'une faible teneur en acétylcholine, difficile à préciser dans le cas particulier, mais considérée comme inférieure à 0,3 par gramme. Il est vrai que l'échantillon comprenait surtout de la substance blanche qui, d'après les données de BARSOUM, est moins riche en acétylcholine que la substance grise. Sur un autre malade, sujet jeune le

cervelet s'est montré considérablement plus riche : 0,4 par gramme environ.

Les quelques formations pathologiques cérébrales que nous avons étudiées sont encore trop peu nombreuses pour que nous puissions dès maintenant en faire état. Signalons seulement qu'elles se sont révélées fort inégales dans leur teneur en esters de la choline. Alors que nous n'en décelions que 0 γ 4 ou moins dans une tumeur cérébrale, qui d'ailleurs était, comme le démontra l'examen histo-pathologique (Dr DECHAUME), une métastase de type « hypernéphrome », nous avons été surpris d'en trouver une quantité beaucoup plus considérable, anormalement élevée dans deux cas : un fragment de néoformation de la fosse cérébrale postérieure accusait de 2 γ 5 à 2 γ 7 d'A.C. par gramme ; nous faisons une constatation analogue dans une tumeur du lobe temporal (2 γ à 2 γ 5 par gramme). Dans ces deux cas, il s'agissait histologiquement de formations de type névroglique, dénommées « astrocytomes ».

Cette richesse en « A.C. - équivalent » de certaines formations pathologiques nous a paru intéressante à signaler dès maintenant, malgré le petit nombre des constatations faites. Elle ouvre la voie à de nouvelles recherches que nous poursuivons d'ailleurs.

L'ACTIVITÉ CHOLINESTÉRASIQUE de ces tumeurs s'est révélée assez intense : 1500 à 2000 dans les deux cas étudiés à ce point de vue. Elle est donc dans l'ordre normal de celle de la substance cérébrale.

Sur des prélèvements faits aux divers étages de l'encéphale, à l'autopsie (un tel prélèvement n'a pas d'incon-

vénient pour les estimations de cholinestérase puisque cette dernière persiste aussi active pendant quelques jours *post mortem*, nous avons décelé des différences assez nettes de leur activité.

La substance blanche est la moins riche en enzyme (800), puis viennent la substance grise cérébrale (1500), la moëlle cervicale (1800), le bulbe et le thalamus (3000), enfin le cervelet (4000 à 5000).

NACHMANSOHN [265] a récemment, par un procédé différent, abouti à des résultats semblables, en gros, aux nôtres : à part le noyau caudé et le noyau lenticulaire dont l'activité cholinestérasique est beaucoup plus grande, et que nous n'avons d'ailleurs pas nous-même étudiés, c'est dans le cervelet qu'il trouve la plus forte concentration en enzyme, bien supérieure à celle du cortex; de la protubérance et même du thalamus.

CONCLUSIONS

Après une mise au point générale de la question de l'acétylcholine dans l'organisme animal : ses propriétés, son dosage, sa répartition quantitative selon les organes, sa destruction hydrolytique par la cholinestérase, son rôle enfin, nous exposons, dans ce travail, nos recherches personnelles portant sur les Invertébrés et sur les Vertébrés. Elles peuvent être succinctement résumées de la façon suivante :

— *La technique de détermination biologique* de l'acétylcholine, à l'aide du muscle dorsal antérieur éseriné de Sangsue, a fait l'objet d'une étude critique. Elle nous a paru, dans l'ensemble, très satisfaisante : pratique et assez précise (10 à 20 % d'erreur). Cette méthode convient pour la détermination de très faibles quantités d'acétylcholine et nous a servi tout au long de ce travail.

— Nous donnons, pour le titrage biologique de l'activité cholinestérasique des tissus, une technique personnelle, déterminant la dilution-limite d'extrait amenant l'hydrolyse totale d'une solution d'acétylcholine de concentration 1.10^{-7} , dans certaines conditions ; cette

hydrolyse complète étant elle-même indiquée par l'absence totale de réaction du muscle éseriné de Sangsue. Nous avons insisté sur les inconvénients de cette méthode qui ne mérite pas le nom de « dosage », mais n'est qu'une estimation pratique et intéressante.

Chez les Invertébrés.

I. — Etudiant la répartition de l' « A.C. équivalent » dans le myocarde des *Mollusques*, nous avons mis en évidence la présence d'une substance analogue à l'acétylcholine, chez les espèces étudiées.

Quantitativement : pauvreté chez les Céphalopodes ($<0 \gamma 1$ par gramme chez *Sepia* et *Octopus*), chez les Lamellibranches (de $0 \gamma 12$ chez *Mytilus* à $0 \gamma 5 - 0 \gamma 7$ par gramme chez *Ostrea*), et chez les Gastéropodes Opisthobranches ($0 \gamma 1 - 0 \gamma 2$ chez *Aplysia*) ; richesse plus grande ($>1 \gamma$ par gramme) chez les Gastéropodes Pulmonés (de $1 \gamma 3$ chez *Helix lucorum* à $7 \gamma 5$ chez *Helix nemoralis*), et surtout chez les Prosobranches ; en particulier, nous signalons la forte teneur du cœur de *Murex* en cet ester (18 à 35γ par gramme).

Parallèlement, myocarde et hémolymphe présentent chez ces espèces une *activité cholinestérasique* d'autant plus intense que leur teneur en « A.C. équivalent » est plus élevée.

Le cœur d'*Helix pomatia* fut l'objet d'investigations plus profondes sur l'état de l'acétylcholine qu'il contient. Nous montrons : que cette substance y est décelée à un taux semblable malgré le prélèvement à très basse température ; qu'elle paraît libre dans cet organe d'où elle

diffuse facilement et où elle est immédiatement dosable par simple broyage en milieu ésériné ; l'action des diffusats et broyats sur le cœur pulsant d'*Helix* lui-même est sommairement étudiée ; nous envisageons enfin la question des rapports de l'ester de la choline et de la cholinestérase dans le même organe, et expérimentalement nous étudions les rapports d'échange entre acétylcholine et cholinestérase *in vitro* séparés par une membrane de collodion perméable à la première, mais non à la seconde.

La constatation d'une haute teneur d'esters de la choline dans le cœur de *Murex* ne nous paraît pas pouvoir expliquer complètement à elle seule les particularités fonctionnelles relevées chez lui par G. MORIN et A. JULLIEN.

II. — Nous donnons la teneur en « A.C. équivalent » des divers organes de *Murex*. La plupart présentent une assez forte teneur en esters de la choline ; ce fait n'est donc point particulier au myocarde chez cet animal. Nous avons constaté le fait curieux que la « glande à pourpre » contient à elle seule la presque totalité de l'activité de type acétylcholine de l'animal entier, sans qu'on puisse le relier nettement avec une fonction particulière actuellement connue de cet organe. Certaines constatations nous font d'ailleurs supposer qu'il s'agit peut-être d'un autre ester de la choline que le dérivé acétylé, puisque l'hydrolyse, suivie d'acétylation, en augmente l'activité plus que l'acétylation directe.

Nous en avons tenté l'extraction et l'identification par voie chimique : obtention relativement facile de cris-

taux de Florence à partir d'extrait hydrolysé, de reineckate, chloroplatinate et chloroaurate. Pour ce dernier, nos constatations, malgré quelques arguments positifs, ne permettent pas de l'identifier formellement avec le chloroaurate d'acétylcholine.

III. — *Chez les Crustacés*, nous avons dosé l'activité acétylcholinique dans divers organes, en particulier dans le système nerveux et le cœur chez *Astacus*, *Palaemon*, etc... et constaté la présence d'une quantité importante de cette substance dans le système nerveux, qui est, de même, riche en activité cholinestérasiq. Enfin, il nous a été donné de démontrer que le sang d'*Astacus fluv.* contient de la cholinestérase, mais que son activité reste assez faible à ce point de vue.

Chez les Vertébrés.

I. — Les organes de Cobaye ont été l'objet de dosages d'acétylcholine et de choline par acétylation, selon la technique de HUNT, GUGGENHEIM, et LÖFFLER.

II. — Après injections sous-cutanées de fortes doses de chlorure d'acétylcholine, on ne retrouve aucune accumulation sensible et durable d'acétylcholine, mais seulement une imprégnation passagère et à peu près homogène des organes par la choline résultant de l'hydrolyse de l'ester injecté ; 24 heures après, cette surcharge en choline elle-même a disparu ; une petite partie seulement a été éliminée par l'urine à l'état de choline, le reste a été sans doute désintégré par des processus oxydatifs.

III. — Par injections de grosses doses d'ésérine au Cobaye, entraînant la mort le plus souvent, nous avons pu mettre en évidence, de façon parfois assez nette, mais inconstante, l'apparition d'acétylcholine libre, immédiatement dosable dans le sang. La quantité trouvée est considérablement plus forte que celle décelée parfois après la mort de l'animal.

IV. — Enfin, nous apportons quelques données analytiques sur des *organes du système nerveux humain*, prélevés opératoirement : ganglions sympathiques, fragments de cerveau sain et de tumeurs cérébrales, dont nous continuons l'étude.

BIBLIOGRAPHIE

1. ABDERHALDEN (E.) und PAFFRATH (H.). — Beitrag zur Frage der Inkret-Hormon Wirkung des Cholins auf die motorischen Funktionen des Verdauungskanal. V. Ueber die Synthese von Cholinestern aus Cholin und Fettsäuren mittels des Dünndarmes. *Erg. Fermentforschung*, 1925, 8, 229.
2. ABDERHALDEN (E.), PAFFRATH (H.) und SICKEL (H.). — Beitrag zur Frage der Inkret-Hormon Wirkung des Cholins auf die motorischen Funktionen des Verdauungskanales. *Arch. f. Physiol.*, 1925, 207, 241.
3. ACKERMANN und KUTSCHER. — Ueber die Extraktstoffe von *Lumbricus terrestris*. *Zeitschr. f. Biol.*, 1922, 75, 736.
4. AGID (R.) et BALKANYI (J.). — Action du liquide d'excitation vagale du cœur de Grenouille sur le muscle de Sangsue éseriné. *C. R. S. Biol.*, 1938, 127, 683.
5. AGREL (M.). — Etude expérimentale des effets de l'acétylcholine sur l'appareil cardio-vasculaire et l'équilibre glycémique. *Thèse Doct. Pharmacie*, Lyon, 1938.
6. AMMON (R.). — Die Fermentative Spaltung des Acetylcholins. *Arch. f. Physiol.*, 1933, 233, 486.
- 6 bis. AMMON (R.). — Die Cholinesterase. *Erg. Enzymforsch.* 1935, 4, 102.
7. AMMON (R.) und KWIATKOWSKI (H.). — Die Bildung von Acetylcholin in Serum und Embryonalextrakt. *Arch. f. Physiol.*, 1934, 234, 269.
8. AMMON (R.) und VOSS (G.). — Die acetylcholinzerstörende Wirkung des Blutes. *Pflügers Arch. f. Phys.*, 1935, 235, 393.
9. ARMSTRONG (P. B.). — The role of the nerves in the action of acetylcholine on the embryonic heart. *Jour. of Physiol.*, 1935, 84, 20.

10. ARVANITAKI (A.) et CARDOT (H.). — Essai sur la régulation chimique de l'automatisme cardiaque chez les Invertébrés. *Jour. de Physiol. et Path. gén.*, 1933, 31, 713.
11. BACQ (Z. M.). — La transmission chimique des influx dans le système nerveux. *Ergebn. d. Physiol.*, 1935, 37, 821.
12. BACQ (Z. M.). — L'Acétylcholine dans les tissus des Invertébrés. *C. R. Soc. Biol.*, 1935, 120, 243.
13. BACQ (Z. M.). — Les esters de la choline dans les extraits des tissus des Invertébrés. *Arch. Intern. Physiol.*, 1935, 42, 24.
14. BACQ (Z. M.). — La cholinestérase chez les Invertébrés. *C. R. Soc. Biol.*, 1935, 120, 247.
15. BACQ (Z. M.). — La cholinestérase chez les Invertébrés, l'insensibilité des Crustacés à l'acétylcholine. *Arch. Intern. Physiol.*, 1935, 42, 47.
16. BACQ (Z. M.). — Nouvelles observations sur l'acétylcholine et la cholinestérase chez les Invertébrés. *Arch. Intern. Physiol.*, 1937, 44, 174.
17. BACQ (Z. M.) et BROWN (G. L.). — Pharmacological experiments on mammalian voluntary muscle, in relation to the theory of chemical transmission. *Jour. of Physiol.*, 1937, 89, 45.
18. BACQ (Z. M.) et COPPÉE (G.). — Contraste entre les Vers et les Mollusques en ce qui concerne leur réaction à l'ésérine. *C. R. Soc. Biol.*, 1937, 125, 1059.
19. BACQ (Z. M.) et COPPÉE (G.). — Réaction des Vers et des Mollusques à l'ésérine. Existence des nerfs cholinergiques chez les Vers. *Arch. Int. Physiol.*, 1937, 43, 310.
20. BACQ (Z. M.) et COPPÉE (G.). — Existe-t-il des nerfs cholinergiques chez les Invertébrés ? XI^e Congrès de l'Ass. des Physiologistes, Paris, 1937, p. 323 (discussion).
- 20 bis. BACQ (Z. M.). — L'Amphiporine et la Némertine, poisons des Vers Némertiens. *Arch. Int. Physiol.*, 1937, 44, 190.
21. BACQ (Z. M.) et MAZZA (F. P.). — Identification d'acétylcholine extraite des cellules ganglionnaires d'*Octopus*. *C. R. Soc. Biol.*, 1935, 120, 246.

22. BACQ (Z. M.) et MAZZA (F. P.). — Isolement de chloroaurate d'acétylcholine à partir d'un extrait de cellules nerveuses d'*Octopus vulgaris*. *Arch. Intern. Physiol.*, 1935, 42, 43.
23. BAIN (W. A.). — The action of adrenaline and of certain drugs upon the isolated crustacean heart. *Quat. Jour. exp. Physiol.*, 1929, 19, 297.
24. BARSOUM (G.). — The acetylcholine equivalent of nervous tissues. *Journ. of Physiol.*, 1935, 84, 259.
25. BAYER (G.) und WENSE (Th.). — Ueber den Nachweis von Hormonen in einzelligen Tieren. Cholin und Acetylcholin im Paramecium. *Arch. f. Physiol.*, 1936, 237, 417.
26. BAYER (G.) und WENSE (Th.). — Die Beeinflussung der Acetylcholinwirkung durch Histamin. *Arch. f. exp. Path. Pharm.*, 1936, 182, 533.
27. BEATTIE (F. J. R.). — A colorimetric method for the determination of choline and acetylcholine in small quantities. *Bioch. Journ.*, 1936, 30, 1554.
28. BEAUVALLET (M.). — Les nerfs viscéraux se rendant à l'intestin d'Escargot agissent-ils par libération d'un médiateur chimique ? *XII^e Congrès de l'Ass. des Physiologistes*, Louvain, 1938.
29. BENETATO (Gr.) et MUNTEANU (N.). — Contribution à l'étude de la transmission chimique de l'influx nerveux au niveau des synapses centraux. *C. R. Soc. Biol.*, 1936, 122, 1128.
30. BERNARD (Claude). — Leçons sur les propriétés physiologiques et les altérations pathologiques des liquides de l'organisme. 1859, T. I, p. 289.
31. BERNARD (F.). — Recherches sur les organes palléaux des Gastéropodes Prosobranches. *Ann. Sc. nat. (Zool.)*, 1890, 84, 404.
32. BERNHEIM (F. et M.). — Oxydation of Acetylcholine by tissues. *Amer. Jour. of Physiol.*, 1933, 104, 438.

33. BERNHEIM (F.) and BERNHEIM (M.). — Action of drugs on the cholinesterase of the brain. *Journ. of Pharm.*, 1936, 57, 427.
34. BERNHEIM (F.). — The interaction of acetylcholine, epinephrine and certain other drugs on the isolated small intestine of the rat. *Jour. of Pharm.*, 1934, 51, 68.
35. BEZNAK (A.). — On the mechanism of the autocoid function of parasympathetic nerves. *Journ. of Physiol.*, 1934, 82, 529.
36. BIANCO (J.). — Lécithine et lécithinases dans le sang artériel et dans le sang surrénal. *C. R. Soc. Biol.*, 1929, 102, 463.
37. BIEDERMANN (W.). — Electrophysiology. Londres, 1898.
38. BINET (L.) et MINZ (B.). — Sur un corps du type de l'acétylcholine présent dans le tronc du nerf vague. *C. R. Soc. Biol.*, 1934, 115, 1669.
39. BINET (L.) et MINZ (B.). — Sur une substance sensibilisante à l'acétylcholine formée dans le tronc du nerf vague au cours de l'excitation électrique. *C. R. Soc. Biol.*, 1934, 117, 1029, 1138.
40. BINET (L.) et PERLÈS. — Etude du cœur de l'Escargot isolé de l'organisme. *Presse Médicale*, 1929, p. 1141.
41. BISCHOFF (G.), GRAB (W.) und KAPFFHAMMER (J.). — Acetylcholin im Rinderblut. *Ztsch. physiol. Chem.*, 1931, 199, 135, 200, 153.
42. BISCHOFF (G.), GRAB (W.) und KAPFFHAMMER (J.). — Acetylcholin im Warmblüter. *Ztsch. physiol. Chem.*, 1932, 207, 57.
43. BLANC (H.). — La survie du cœur isolé. *Thèse Doct. Sciences*, Lyon, 1935.
44. BLUM (J. D.). — Contribution à l'étude de l'acétylcholine dans le sang. *Arch. Intern. Physiol.*, 1938, 46, 86.
45. BOEHM (R.). — Über das Vorkommen und die Wirkungen des Cholins und die Wirkungen der künstlichen Muskarin. *Arch. f. exp. Path. und Pharmak.*, 1885, 19, 87-100.

46. BONNET (V.). — Antagonisme acétylcholine-strychnine chez l'Ecrevisse. *C. R. Soc. Biol.*, 1937, 124, 996.
47. BONNET (V.) et BREMER (F.). — Action du potassium, du calcium et de l'acétylcholine sur les activités électriques spontanées et provoquées de l'écorce cérébrale. *C. R. Soc. Biol.*, 1937, 126, 127.
48. BOUCHET (M.), JULLIEN (A.), VINCENT (D.) et VUILLET (M.). — Sur la diffusion de l'acétylcholine à partir du cœur d'*Helix pomatia*. *C. R. Acad. Sciences*, 1938, 206, 460.
49. BROUN (D.) et SCHEINER (H.). — Sur l'état physico-chimique de l'acétylcholine dans le sang. *C. R. Acad. Sc.*, 1935, 201, 1046.
50. BROWN (G. L.), DALE (H. H.) and FELDBERG (W.). — Chemical transmission of excitation from motor nerve to voluntary muscle. *Jour. of Physiol.*, 1937, 87, 42P.
51. BROWN (G. L.). — The action of acetylcholine on denervated mammalian and frog's muscles. *Jour. of Physiol.*, 1937, 89, 438.
52. BROWN (G. L.), DALE (H. H.) and FELDBERG (W.). — Reaction of the normal mammalian muscle to acetylcholine and to eserine. *Jour. of Physiol.*, 1936, 87, 394.
53. BROWN (G. L.) and FELDBERG (W.). — Effects of potassium chloride on a sympathetic ganglion. *Jour. of Physiol.*, 1935, 84, 12P.
54. BROWN (G. L.) and FELDBERG (W.). — The acetylcholine metabolism of sympathetic ganglion. *Journ. of Physiol.*, 1936, 88, 265.
55. BRÜCKE (F. Th. v.). — The cholinesterase in sympathetic ganglia. *Journ. of Physiol.*, 1937, 89, 429.
56. BRÜCKE (F. Th. v.). — The response of a denervated ganglion to acetylcholine. *Journ. of Physiol.*, 1938, 91, 375.
57. BUCKTAL (F.) and LINDHARD (J.). — Direct application of acetylcholine to motor end plates of voluntary muscle fibres. *Proc. Physiol. Soc., Journ. of Physiol.*, 1937, 90, 82 P.

58. BUSQUET (H.). — L'automatisme rythmique du muscle de Sangsue par le phénylbarbiturate de quinine. Sa résistance à KCl. *C. R. Soc. Biol.*, 1937, 125, 618.
59. BUY (H. G. du). — The electrical phenomena on the crustacean nerve muscle system. *Amer. Journ. of Physiol.*, 1935, 114, 224.
60. BYKOW. — Transmission chimique de l'excitation dans les appareils nerveux centraux. XV^e Congrès Intern. de Physiol., 1935, p. 49.
61. CALMETTE (A.). — Procédé simple de préparation des sacs de collodion extra-minces pour les cultures *in vivo* et *in vitro*. *C. R. Soc. Biol.*, 1931, 108, 768.
62. CARAYON-GENTIL et GAUTRELET (J.). — Contribution à l'étude de la présence de la choline chez les Invertébrés. *C. R. Soc. Biol.*, 1938, 127, 887.
63. CARDOT (H.). — Réactions du cœur de quelques Mollusques à l'excitation électrique. *Journ. de Physiol. et Path. gén.*, 1909, 11, 787.
64. CARDOT (H.). — Action des solutions de Ringer hypertoniques sur le cœur isolé d'*Helix pomatia*. *C. R. Soc. Biol.*, 1921, 85, 813.
65. CARDOT (H.). — Réaction du cœur isolé à une augmentation du taux de potassium. *C. R. Soc. Biol.*, 1922, 87, 1193.
66. CARDOT (H.). — L'automatisme cardiaque d'après les recherches relatives aux Invertébrés. *Ann. de Physiol. et Phys. Chim.*, 1933, 9, 585.
67. CHANG (H. C.). — Penetration of performed acetylcholine in human placenta. *Chinese Physiol. Soc. 1935 Proc. 8th. Annual Meeting.*
68. CHANG (H. C.). — Rate of formation of acetylcholine in Placenta *in vitro*. *Proc. Soc. exp. Biol.*, N.-Y., 1935, 32, 1001.
69. CHANG (H. C.) and GADDUM (J. H.). — Choline esters in tissue extracts. *Journ. of Physiol.*, 1933, 79, 255.

70. CHANG (H. C.), WEN (I. C.) and WONG (A.). — On the site of occurrence formation and significance of acetylcholine in human placenta. *XV° Intern. Physiol. Congress. U.R.S.S.*, 1935, p. 54.
71. CHANG (H. C.) and WONG (A.). — Origine and fate of acetylcholine in human placenta. *Chinese Journ. Physiol.*, 1933, 7, 151.
72. CLARK (A. J.). — The action of ions and lipoids upon the frog's heart. *Journ. of Physiol.*, 1913, 47, 66.
73. CLARK (A. J.). — General Pharmacology. *Handb. d. exp. Pharm.*, 1937, 4, 73.
74. CORTEGGIANI (E.). — Recherches sur l'acétylcholine libre et combinée dans le cerveau. *C. R. Soc. Biol.*, 1937, 124, 1197.
75. CORTEGGIANI (E.). — Influence de l'ésérine sur la stabilité du complexe libérant l'acétylcholine par chauffage. *C. R. Soc. Biol.*, 1937, 125, 944.
75. CORTEGGIANI (E.). — Existence du complexe libérant l'acétylcholine sous l'influence de la chaleur dans divers organes de Vertébrés. *C. R. Soc. Biol.*, 1937, 125, 949.
77. CORTEGGIANI (E.). — Contribution à l'étude de l'acétylcholine libre et dissimulée sous forme de complexe dans le cerveau. *Thèse Doct. Sciences*, Paris, 1938.
78. CORTEGGIANI (E.), GAUTRELET (J.), KASWIN (A.) et MENTZER (C.). — Sur l'existence d'un complexe libérant l'acétylcholine dans les centres nerveux sous l'influence de la chaleur. *C. R. Soc. Biol.*, 1936, 123, 667.
79. CORTEGGIANI (E.), GAUTRELET (J.), HALPERN (N.) et SERFATY (A.). — Action inhibitrice de l'aldéhyde formique sur l'activité de la cholinestérase du sang. *C. R. Soc. Biol.*, 1936, 121, 316.
80. CORTEGGIANI (E.), CARAYON-GENTIL (A.), GAUTRELET (J.) et KASWIN (A.). — Reconstitution *in vitro* du complexe libérant l'acétylcholine du cerveau. *C. R. Soc. Biol.*, 1935, 945.

81. COWAN (S. L.). — The initiation of all or none responses in muscles by acetylcholine. *Proc. Physiol. Soc.*; *Journ. of Physiol.*, 1936, 88, 3 P.
82. DALE (H. H.). — The action of certain esters and ethers of choline and their relation to muscarine. *Journ. of Pharm.*, 1914, 6, 147.
83. DALE (H. H.). — Nomenclature of fibres in the autonomic system and their effects. *Journ. of Physiol.*, 1933, 80, 10 P.
84. DALE (H. H.). — Du Bois Reymond and Chemical transmission. *Proc. Physiol. Soc.*, *Journ. of Physiol.*, 1937, 91, 4 P.
- 84 bis. DALE (H. H.). — Pharmacology and nerve endings. *Proc. Roy. Soc. M.* 1935, 28, 319.
85. DALE (H. H.) and DUDLEY (H. W.). — The presence of histamine and acetylcholine in the spleen of the ox and the horse. *Journ. of Physiol.*, 1929, 68, 97.
86. DALE (H. H.) and FELDBERG (W.). — The chemical transmitter of vagus effect to the stomach. *Journ. of Physiol.*, 1934, 81, 320.
87. DALE (H. H.) and FELDBERG (W.). — Chemical transmission at motor nerve endings in voluntary muscle. *Journ. of Physiol.*, 1934, 81, 39 P.
88. DALE (H. H.) and FELDBERG (W.). — The chemical transmitter of nervous stimuli to the sweat glands of the cat. *Journ. of Physiol.*, 1934, 81, 40 P.
89. DALE (H. H.) and GADDUM (J. H.). — Reactions of denervated voluntary muscle and their bearing on the mode of action of parasympathetic and related nerves. *Journ. of Physiol.*, 1930, 70, 109.
90. DALE (H.) and GASSER (H. S.). — The pharmacology of denervated mammalian muscle. The nature of the substances producing contracture. *Journ. of Pharm.*, 1926, 29, 53.
91. DASTUGUE (G.). — Action de quelques anesthésiques sur le tonus du muscle dorsal de Sangsue et sur sa sensibilité à l'acétylcholine. *C. R. Soc. Biol.*, 1936, 121, 220.

92. DEMOOR (J.). — Le mécanisme humoral du travail automatique de l'intestin. *Arch. Int. de Physiol.*, 1936, 42, 425.
93. DERRIEN (F.). — L'odeur de la pourpre. *Bull. Ac. Sc. et Lettres*, Montpellier, 1911, 168.
94. DIKSHIT (B. B.). — Action of acetylcholine on the brain and its occurrence therein. *Journ. of Physiol.*, 1934, 80, 409.
95. DIKSHIT (B. B.). — The presence in the brain of a substance resembling acetylcholine. *Journ. of Physiol.*, 1933, 79, 1.
96. DODEL et DASTUGUE. — Etude pharmacodynamique du muscle dorsal antérieur de Sangsue, réactif biologique de l'acetylcholine. *Bull. Sc. Pharm.*, 1937, p. 145.
97. DOGIEL. — Die Muskeln und Nerven des Hertzens bein einiger Mollusken. *Arch. f. mikr. Anat.*, 1877, 14, 59 ; 1878, 15, 95.
98. DUBOIS (R.). — Recherches sur la pourpre et sur quelques autres pigments animaux. *Arch. Zool. exp. gén.*, 1909, 42, 471-590.
99. DUDLEY (H. W.). — Observations on Acetylcholine. *Bioch. Journ.*, 1929, 23, 1064.
100. DUDLEY (H. W.). — Co-ordination Compounds of the chloroplatinate of choline and its esters. *Journ. of Chem. Soc.*, 1931, 4, 763.
101. DUDLEY (H. W.). — The alleged occurrence of acetylcholine in ox blood. *Journ. of Physiol.*, 1933, 79, 249.
102. EASSON (L. H.) and STEDMAN (E.). — The specificity of choline-esterase. *Bioch. Journ.*, 1937, 31, 1723.
103. ECCLES (J. C.). — Synaptic and neuro muscular transmission. *Physiol. Reviews*, 1937, 17, p. 538.
104. EGGLETON (P.). — The action of pure phosphatides on the perfused heart of the frog. *Bioch. Journ.*, 1926, 26, 395.
105. EIGER (M.). — Les ganglions et les cellules nerveuses sous-endocardiques ; leur rôle dans l'automatisme du

- cœur. *Medycyna Doswiadczalna i Spoteczna*, 1930, 11, 88.
106. ELLINGER (Ph.). — Über die Verteilung des injizierten Cholins im Organismus. *Münch. med. Woch.*, 1914, 2336.
107. EMMELIN (N.) und KAHLSON (G.). — Über Beziehungen zwischen Kontraktionsgrosse von Kreatinin und Acetylcholin. *Skand. Arch. f. Physiol.*, 1937, 77, 297.
108. EMMELIN (N.) und KAHLSON (G.). — Versuche zur Deutung des Antagonismes zwischen Curare, Pentamethylen-tetrazol und Pyridin carbonsaurediathylamid. *Skand. Arch. f. Physiol.*, 1937, 77, 312.
109. ENGELHARDT (E.). — Die Vagustoffverteilung auf Vorhof und Kammer bei Frosch und Säuger. *Arch. f. Physiol.*, 1930, 225, 721.
- 109 bis. ENGELHARDT (E.) und LÆWI (O.). — Fermentative Azetylcholin spaltung im Blut, und ihre Hemmung durch Physostigmin. *Arch. f. exp. Path. u. Pharm.*, 1930, 150, 1.
110. ETTINGER (G. H.) and HALL (G. E.). — Acetylcholin in Ox and Dog blood. *Journ. of Physiol.*, 1934, 82, 38.
111. EULER (U. S.) and GADDUM (J. H.). — An unidentified depressor substance in certain tissue extracts. *Journ. of Physiol.*, 1931, 72, 74.
112. EWINS (A. J.). — Acetylcholine, a new active principle of ergot. *Bioch. Journ.*, 1914, 8, 44.
113. FELDBERG (W.). — Die Wirkung von Histamin und Acetylcholin auf die glatte Muskulatur und ihre Beeinflussung durch Atropin. *Revue de Pharmacologie*, 1933, 2, 311.
114. FELDBERG (W.) and GADDUM (J. H.). — The chemical transmitter at synapses in a sympathetic ganglion. *Journ. of Physiol.*, 1934, 81, 305.
115. FELDBERG (W.), MINZ (B.) and TSUDZIMURA (H.). — The mechanism of the nervous discharge of adrenaline. *Journ. of Physiol.*, 1934, 81, 286.

116. FELDBERG (W.) und ROSENFELD (P.). — Der Nachweis eines acetylcholinartigen Stoffes im Pfortaderblut. *Arch. f. Physiol.*, 1933, 232, 212.
117. FELDBERG (W.) and SCHILD. — Distribution of choline and acetylcholine in suprarenal glands. *Journ. of Physiol.*, 1934, 81, 37 P.
118. FELDBERG (W.) and SCHRIEVER (H.). — The acetylcholine content of the cerebro-spinal fluid of dogs. *Journ. of Physiol.*, 1936, 86, 277.
119. FESSARD (A.). — Recherches sur l'activité rythmique des nerfs isolés. Paris, Hermann, 1936.
120. FISCHER (P. H.). — Sur le rôle de la glande purpurigène des *Murex* et des *Pourpres*. *C. R. Acad. Sciences*, 1925, 180, 1369.
121. FLEISCH (A.). — Une nouvelle substance vaso-dilatatrice contenue dans les érythrocytes. *C. R. Assoc. libre des Physiol. Suisses*, 1937, juin, p. 13.
122. FLEISCH (A.), SIBUL (L.) et KÄELIN (M.). — De l'apparition de l'acétylcholine dans le sang. *Arch. Intern. Physiol.*, 1936, 44, 24.
123. FONTAINE (Th.). — Action sur le muscle de Sangsue de divers poisons musculaires et de différentes substances biologiques. *C. R. Soc. Biol.*, 1935, 119, 1.045.
124. FRANCHINI. — Untersuchungen über Lecithin, Cholin und Ameisensäuren. *Arch. di Farmac. sper. e. scienze off.*, 1908, 7, 371.
125. FRANCK (E.). — Die parasympathische Innervation der quergestreiften Muskulatur und ihre klinische Bedeutung. *Klin. Woch.*, 1920, 31, 725.
126. FRANCK (E.), NOTHMANN (N.) und HIRSCH-KAUFFMANN (N.). — Ueber die « tonische » Kontraktion des quergestreiften Säugtiermuskels nach Ausschaltung der motorischen Nerven. Untersuchungen an der Muskulatur der Extremitäten. *Arch. f. Physiol.*, 1923, 198, 391.
127. FRANEL (L.). — L'acétylcholine dans le sang chez l'animal à l'état de repos et de travail musculaire. *Arch. Intern. Physiol.*, 1935, 44, 266.

128. FRÉDÉRICQ (H.). — La transmission humorale des excitations nerveuses. *Rapp. Soc. Biol.*, 1927.
129. FRIEDLANGER (P.). — Über den Farbstoff des antiken Purpurs aus *Murex brandaris*. *Ber. deutsch. Chem. Ges.*, 1909, 42, 165.
130. FÜHNER (H.). — Die quantitative Bestimmung des Cholins auf biologischen Wege. *Bioch. Ztsch.*, 1916, 77, 408.
131. FÜHNER (H.). — Ein Vorlesungsversuch zur Demonstration der erregbarkeitsteigernden Wirkung des Physostigmins. *Arch. f. exp. Path.*, 1918, 82, 81.
132. FÜHNER (H.). — Untersuchungen über den Synergismus von Giften. Die chemische Erregbarkeiteigerung glatter Muskulatur. *Arch. f. exp. Path.*, 1918, 82, 51.
133. FÜHNER (H.). — Untersuchungen über die periphere Wirkung des Physostigmins. *Arch. f. exp. Path.*, 1918, 82, 205.
134. FÜRTH (O.) und SCHWARTZ (K.). — Über die Natur der Brutdruckerniedrigenden Substanz in der Schilddrüse. *Arch. f. Phys.*, 1908, 124, 361.
135. GADDUM (J. H.). — Gefässerweiternde Stoffe der Gewebe. Leipzig, Georges Thieme, 1936.
136. GADDUM (J. H.), KHAYAL (M.) and RYDIN (H.). — The release of pharmacologically active substances by nerve trunks during electrical stimulation. *Jour. of Physiol.*, 1937, 89, 37 P.
137. GALEHR (O.) und PLATTNER (F.). — Ueber das Schicksal des Acetylcholins im Blute. *Arch. f. Physiol.*, 1928, 218, 488 et 506.
138. GAUTRELET (J.). — La choline, son rôle hypotenseur dans l'organisme. Contribution à l'étude des coordinations fonctionnelles. *C. R. Acad. Sc.*, 1909, I, 995, et *Journ. Physiol. et Path. gén.*, 1909, 227.
139. GAUTRELET (J.). — Contribution à l'étude de la choline dans la série animale. *Congrès int. de Physiol.*, Vienne 1910.

140. GAUTRELET (J.). — La choline et l'adrénaline dans l'organisme. Leur rôle dans la transmission humorale de l'excitation nerveuse limitée aux Vertébrés. *Bull. Acad. Médecine*, 1935, **113**, 238.
141. GAUTRELET (J.). — Myéline et fibres cholinergiques. *La Médecine*, 1935, p. 742.
142. GAUTRELET (J.). — Contribution à l'étude de la choline dans l'organisme animal. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1936, **18**, 449.
143. GAUTRELET (J.), CORTEGGIANI (E.), KASWIN (A.) et MENTZER (C.). — Libération diastasique d'acétylcholine par le foie. *C. R. Soc. Biol.*, 1936, **123**, 664.
144. GAUTRELET (J.), CORTEGGIANI (E.), KASWIN (A.) et SERFATY (A.). — Du mécanisme de la sensibilisation du muscle de la Sangsue par l'ésérine vis-à-vis de l'acétylcholine. *C. R. Soc. Biol.*, 1936, **122**, 377.
145. GAUTRELET (J.) et HALPERN (N.). — Antagonisme du curare, du cyanure d'éthyle et de l'hémolymph vis-à-vis de l'action inhibitrice de l'acétylcholine sur le cœur d'*Helix pomatia*. Influence de l'ésérine. *C. R. Soc. Biol.*, 1935, **118**, 412.
146. GAUTRELET (J.), HALPERN (N.) et CORTEGGIANI (E.). — Le sort de l'adrénaline et de l'acétylcholine dans l'organisme. *La Médecine*, 1935, 726.
147. GAUTRELET (J.), SCHEINER (H.) et KASWIN (A.). — Choline ultra filtrable du sang et excitation vagale. *C. R. Soc. Biol.*, 1938, **127**, 1435.
148. GAYET (R.) et MINZ (B.). — La libération d'acétylcholine dans le sang de la veine pancréatico-duodénale par stimulation des nerfs splanchniques. *C. R. Soc. Biol.*, 1936, **123**, 1157.
149. GAYET (R.) et MINZ (B.). — La libération d'acétylcholine déterminée dans le sang de la veine pancréatico-duodénale par l'injection d'ergotamine. *C. R. Soc. Biol.*, 1936, **123**, 1160.
150. GLICK (D.). — Properties of choline-esterase in human serum. *Bioch. Jour.*, 1937, **31**, 521.

151. GOLLWITZER-MEIER (K.). — Zur Frage des Acetylcholins im Rinderblut. *Arch. exp. Path.*, 1934, 474, 456.
152. GOLLWITZER-MEIER (K.) und KRUEGER. — Acetylcholin in Frischmilz und Frischblut. *Arch. exp. Path.*, 1934, 476, 642.
153. GRYNFELDT (E.). — Sur la glande hypo-branchiale de *Murex trunculus*. *Bibl. Anat.*, 1911, 21, 181.
154. GRYNFELDT (E.). — Glande hypo-branchiale et organe de la pourpre chez quelques *Murex* indigènes des côtes de Languedoc. *Bull. Acad. Sc. et Lettres*, Montpellier, 1913, 5.
155. GUGGENHEIM (M.). — Les amines biologiques. Edit. française. *Baillière*, 1934, Paris, Trad. Berthelot, Prévot et Karl.
156. GUGGENHEIM (M.) und LÖFFLER (W.). — Ueber das Vorkommen und Schicksal des Cholins im Tierkörper. *Bioch. Ztsch.*, 1916, 74, 209.
157. GULEWITSCH (W.). — Ueber Cholin und einige Verbindungen desselben. *Ztsch. Physiol. Chem.*, 1898, 24, 513.
158. HALPERN (N.) et CORTEGGIANI (E.). — Etude comparative de la destruction de l'acétylcholine par divers organes de Cobaye, de Grenouille et d'Escargot. *C. R. Soc. Biol.*, 1935, 119, 1.049.
159. HAUPSTEIN (P.). — Das Acetylcholine in dem menschlichen Placenta. *Arch. f. Gynec.*, 1932, 151, 262
160. HENDERSON and WILSON. — Intraventricular injection of acetylcholine and eserine in man. *Quart. Journ. of exp. Physiol.*, 1936, 26, 83.
161. HERMANN (H.). — La théorie de la transmission numorale de l'excitation nerveuse. Examen de sa validité sur la glande médullo-surrénale. *La Médecine*, 1938, 49, 705.
162. HERMANN (H.), JOURDAN (F.), MORIN (G.) et VIAL (J.). — Etude des propriétés adrénalino-sécrétrices de l'acétylcholine. Relations d'expériences effectuées à l'aide de la technique du Chien sans moelle. *Arch. int. Pharm. et Thérapie*, 1937, 57, 403.

163. HERMANN (H.), JOURDAN (F.), MORIN (G.) et VIAL (J.). — L'ésérine intensifie l'action adrénalino-sécrétrice de l'acétylcholine. *C. R. Soc. Biol.*, 1937, **124**, 317.
164. HERMANN (H.), JOURDAN (F.), MORIN (G.) et VIAL (J.). — Esérine et adrénalino-sécrétion potassique. *C. R. Soc. Biol.*, 1938, **127**, 613.
165. HERMANN (H.), JOURDAN (F.), MORIN (G.) et VIAL (J.). — Potassium et adrénalino-sécrétion. *C. R. Soc. Biol.*, 1938, **127**, 319, 617.
166. HOESSLIN (Hv.). — Ueber der Abbau des Cholins in Tierkörper. *Beitr. z. Chem. Physiol. und Path.*, 1906, **8**, 27.
167. HOFFMANN (E.). — Ueber die Hydrolyse von Acetylcholin-chloridlösungen. *Helv. Chim. Acta*, 1930, **13**, 138.
168. HOFFMANN (P.). — Über die doppelte Innervation der Krebsmuskeln, zugleich ein Beitrag zur Kenntnis nervöser Hemmungen. *Zeitschr. Biol.*, 1914, **63**, 411 ; **64**, 247.
169. HOLMES (E.). — Biochemical approaches to the study of the function of the nervous system. *Perspectives in Biochemistry*, 1937, Cambridge, p. 308.
170. HOUSSAY (B. A.) et MOLINELLI (E. A.). — Action de diverses substances sur la sécrétion d'adrénaline. *C. R. Soc. Biol.*, 1925, **93**, 1637.
171. HUNT (Reid). — A physiological test for cholin and some of its applications. *Jour. of Pharmac. and exp. Therap.*, 1915, **7**, 310.
- 171 bis. HUNT (R.). — Vasodilatator reactions. *Amer. Jour. of Physiol.*, 1918, **45**, 197.
172. HUNT (R.) and TAVEAU (R. de). — On the physiological action of certain choline derivatives and new methods for detecting choline. *Brit. Med. Journ.*, 1906, **2**, 1788.
173. ING and WRIGHT. — The curariform action of quaternary ammonium salts. *Proc. Roy. Soc. London*, 1932, **B**, **109**, 337.

174. ING and WRIGHT. — Further studies on pharmacological properties of Onium salts. *Proc. Roy. Soc. London*, 1934, B, 114, 48.
175. JASPER (H. H.). — Recherches sur l'excitabilité et les caractères de la réponse dans le système neuro-musculaire des Crustacés. *Arch. Int. Physiol.*, 1935, 41, 281.
176. JONES and MAJOR. — Acetylcholine chloride. *Amer. Chem. Soc.*, 1930, 52, 307.
177. JULLIEN (A.). — De l'action de certains poisons sur le cœur de l'Huitre et des Mollusques en général. *Jour. de Physiol. et Path. gén.*, 1936, 34, 774.
178. JULLIEN (A.). — Action de l'atropine et de l'acétylcholine sur le cœur de l'Huitre et, plus généralement, action de ces deux substances sur le cœur des Mollusques. *C. R. Soc. Biol.*, 1935, 119, 603.
179. JULLIEN (A.). — Des réactions comparées des cœurs de Vertébrés et d'Invertébrés vis-à-vis des électrolytes et des drogues. *Thèse Doct. Médecine*, Lyon, 1936.
180. JULLIEN (A.) et MARDUEL (H.). — Action du courant continu sur le ventricule isolé et pulsant de Moule. *C. R. Soc. Biol.*, 1938, 127, 319.
181. JULLIEN (A.) et MARDUEL (H.). — Réaction du cœur de *Murex trunculus*, au passage d'un courant constant. *C. R. Soc. Biol.*, 1938, 127, 121.
182. JULLIEN (A.) et VAIREL-BLANC (H.). — L'activité automatique cardiaque et la propagation de la contraction en rapport avec la structure du cœur chez *Helix pomatia*. *Jour. Physiol. et Path. gén.*, 1937, 35, 673.
183. JULLIEN (A.) et VINCENT (D.). — Sur l'action de l'acétylcholine sur le cœur des Mollusques. L'antagonisme curare-acétylcholine. *C. R. Acad. Sc.*, 1938, 206, 209.
184. JULLIEN (A.) et VINCENT (D.). — Les esters de la choline dans quelques organes de Mollusques. *C. R. Acad. Sc.*, 1938, 206, 1145.
185. JULLIEN (A.) et VINCENT (D.). — Sur les esters de la choline et la cholinestérase chez les Crustacés. *Soc. de Biol.*, Lyon, 24 oct. 1938.

186. JULLIEN (A.), VINCENT (D.), BOUCHET (M.) et VUILLET (M.).
— Action de divers extraits de cœur de Mollusques sur le cœur de Grenouille. *C. R. Soc. Biol.*, 1938, **127**, 1495.
187. JULLIEN (A.), VINCENT (D.), BOUCHET (M.) et VUILLET (M.).
— Libération d'acétylcholine à partir du myocarde de quelques Mollusques. *C. R. Soc. Biol.*, 1938, **127**, 1134.
188. JULLIEN (A.), VINCENT (D.), BOUCHET (M.) et VUILLET (M.).
— Observations sur l'acétylcholine et la cholinestérase chez les Mollusques. 12^e réunion de l'Assoc. des *Physiol.*, Louvain, 1938 ; *Annales de Physiol.*, 1938, **44**, 567.
189. JULLIEN (A.), VINCENT (D.), BOUCHET (M.) et VUILLET (M.).
— Contribution à l'étude de l'action des extraits cardiaques sur l'automatisme du cœur chez les Mollusques. *Jour. Physiol. et Path. gén.*, 1938 (sous presse).
190. JULLIEN (A.), VINCENT (D.), BOUCHET (M.) et VUILLET (M.).
— Nouvelles observations relatives aux actions et antagonismes de quelques substances pharmaco-dynamiques sur le cœur d'*Helix pomatia*. *Soc. de Biol.*, Lyon, 11 juillet 1938.
191. JULLIEN (A.), VINCENT (D.), BOUCHET (M.) et VUILLET (M.).
— De l'action des extraits cardiaques sur l'automatisme du cœur d'*Helix pomatia*. *Soc. Biol.*, Lyon, 11 juillet 1938.
192. KAHANE (E.). — Sur la spécificité de la réaction de Florence. *C. R. Soc. Biol.*, 1929, **101**, 909.
193. KAHANE (E.). — L'acétylcholine dans le sang. *Journ. Méd. Pharm.*, Lille, mars 1934.
194. KAHANE (E.). — Le sel de Reinecke. *Journ. Pharm. et Chim.*, 1935 (8), **22**, 254.
195. KAHANE (E.). — Recherches sur la biochimie de la choline et de ses dérivés. L'acétylcholine du sang. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1936, **48**, 479.
196. KAHANE (E.). — La choline en Biochimie. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1937, **49**, 205.

- 196 bis. KAHANE (E.) et COUPECHOUX (R.). — Dosage bromométrique des sulfocyanures. Application à la micro-analyse et à l'analyse des reineckates. *Bull. Soc. Chim. France*, 1936, 5^e série, 3, 1588.
197. KAHANE (E.) et LÉVY (J.). — Sur la présence à l'état dissimulé d'une substance acétylcholinique dans le sang normal. *C. R. Ac. Sc.*, 1936, 202, 1210.
198. KAHANE (E.) et LÉVY (J.). — Caractérisation et dosage de l'acétylcholine dans les substances biologiques. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1936, 48, 505.
199. KAHANE (E.) et LÉVY (J.). — Inhibition de l'hydrolyse de l'acétylcholine par le sérum. *C. R. Soc. Biol.*, 1936, 421, 1596.
200. KAHANE (E.) et LÉVY (J.). — Sur le mécanisme de la sensibilisation à l'acétylcholine. *C. R. Acad. Sc.*, 1937, 204, 1752.
- 200 bis. KAHANE (E.) et LÉVY (J.). — Action du sang sur quelques ammoniums quaternaires à fonction ester. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1936, 48, 529.
201. KAHANE (E.) et LÉVY (J.). — Recherches sur la biochimie de la choline et de ses dérivés. Action des muscles de Sangsue et de Grenouille sur quelques ammoniums quaternaires à fonction ester. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1937, 49, 976.
202. KAHANE (E.) et LÉVY (J.). — Influence de quelques agents antiestérasiqes sur l'activité pharmacodynamique de l'acétylcholine. *C. R. Soc. Biol.*, 1937, 425, 252.
203. KAHANE (E.) et LÉVY (J.). — Sur la présence à l'état dissimulé d'une substance acétylcholinique dans le sang normal. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1937, 49, 777.
204. KAHANE (E.) et LÉVY (J.). — Apparition de la choline dans les substances biologiques. La choline du sperme. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1937, 49, 959.
205. KAHANE (E.) et LÉVY (J.). — Sur la possibilité de doser dans le plasma l'acétylcholine libre du sang. *C. R. Soc. Biol.*, 1938, 427, 10.

206. KAHANE (E.) et LÉVY (J.). — Rapport entre l'acétylcholine dissimulée et l'acétylcholine libre du sang et des tissus. 12^e Congrès de l'Assoc. des *Physiol.*, Louvain, 1938.
207. KAHLSON (G.). — Zum biologischen Nachweis von Cholin und Acetylcholin. *Arch. f. exp. Path.*, 1932, 169, 34.
208. KAHLSON (G.). — Nachweis und Vorkommen des preformierten Acetylcholins in Blut und Geweben. *Arch. f. exp. Path.*, 1934, 175, 198.
209. KAHLSON (G.) und RÖEMER (R.). — Enthalt das normale Blut chemisch nachweisbares Acetylcholin. *Arch. f. exp. Path.*, 1934, 175, 223.
210. KAHLSON (G.) und UVNAS (B.). — Zur Theorie der Sensibilisierung für Acetylcholin, zugleich Bericht über eine erregbarkeitssteigernde Wirkung des Fluorids. *Scand Arch. f. Physiol.*, 1935, 72, 215.
211. KAPFHAMMER (J.) und BISCHOFF (C.). — Acetylcholin und Cholin aus tierischen Organen. *Ztsch. Physiol. Chem.* 1930, 191, 179.
212. KATZ (B.). — Neuromuscular transmission in Crabs. *Journ. of Physiol.*, 1936, 87, 199.
213. KIBJAKOW (A. W.). — Über humorale Übertragung der Erregung von einem Neuron auf das andere. *Pflüg. Arch. f. g. Phys.*, 1933, 322, 432.
214. KINOSHITA. — Über den cholin Gehalt tierischer Gewebe. *Pflüg. Arch. f. ges. Physiol.*, 1910, 132, 607-631.
215. KOCHTOJANZ (Ch. S.). — De la cholinestérase chez les Invertébrés. *Ukrainian Bioch. Jour.*, 1936, 9, 665.
216. KREITMAIR (H.). — Eine neue Klasse Cholinestern. *Arch. f. exp. Path. und Pharm.*, 1932, 164, 346.
217. KRUTA (V.). — Effets de l'excitation des nerfs viscéraux sur l'activité cardiaque des Céphalopodes. *C. R. Soc. Biol.*, 1936, 122, 582.

218. KWIATKOWSKI (H.). — Acetylcholingehalt der Nerven des Gehirns und Rückenmarks. *Arch. f. exp. Path.*, 1935, 177, 154.
219. LAPICQUE (L.). — Excitants et paralysants dans le domaine du système nerveux autonome. *Ann. de Physiol.*, 1934, 10, 555.
220. LAPICQUE (L.) et CARDOT (H.). — Actions polaires antagonistes dans l'excitation électrique du cœur de l'Escargot. *C. R. Soc. Biol.*, 1909, 67, 115.
221. LARSON. — Alleged occurrence of acetylcholine and adrenalin in cat's saliva. *Journ. of Pharm.*, 1935, 54, 341.
222. LEFEBVRE et MINZ (B.). — Intermédiaires chimiques dans la régulation chronaxique médullaire. *C. R. Soc. Biol.*, 1936, 122, 1.302.
223. LE HEUX (J. W.). — Cholin als Hormon der Darmbewegung. *Arch. f. Physiol.*, 1918, 173, 8 ; 1919, 179, 177, et 1921, 190, 280.
224. LEMATTE (L.), BOINOT (G.) et KAHANE (E.). — Sur les solutions injectables de chlorure d'acétylcholine. Solutions aqueuses et solutions anhydres. *Jour. Pharm. et Chim.*, 1932, 15, 49.
225. LEMATTE (L.), BOINOT (G.) et KAHANE (E. et M.). — Dosage de la choline et de l'acétylcholine. Détermination de l'indice de décomposition de l'acétylcholine. *Journ. Pharm. et Chim.*, 1931, 13, 371.
226. LETELLIER (A.). — Recherches sur la pourpre produite par le *Purpura lapillus*. *Arch. Zool. exp.* 1890, 8, 382.
227. LÉVY (J.) et OLSZYCKA (L.). — Recherches sur la biochimie de la choline et de ses dérivés. Technique de dosage biologique de l'acétylcholine. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1936, 18, 490.
228. LÉVY (J.) et JUSTIN-BESANÇON (L.). — Les médicaments sympatholytiques. *Rapport au 24^e Congrès de Médecine*, Paris, 1936.
229. LEWIS (G. T.) et LUDUENA (F. P.). — Action de l'atropine sur la sécrétion d'adrénaline produite par l'excitation

des nerfs splanchniques, la nicotine et les ammoniums quaternaires. *C. R. Soc. Biol.*, 1934, 116, 1085.

230. LISON (L.). — Etude histochimique sur la glande à pourpre des *Murex*. *Jour. Physiol. et Path. gén.*, 1933, 31, 82.
231. LOACH. — The alleged occurrence of acetylcholine in normal ox blood. *Journ. of Physiol.*, 1934, 82, 118.
232. LÆWI (O.). — Ueber humorale Uebertragbarkeit der Herznervenwirkung. *Arch. f. Physiol.*, 1921, 189, 239 ; 1922, 193, 201.
233. LÆWI (O.). — The ferrier lecture on Problems connected with the principle of humoral transmission of nervous impulses. *Proc. Roy. Soc., B*, 1935, 118, 299.
234. LÆWI (O.). — Ueber eine wasserunlösliche Zustandsform des Acetylcholins im Zentralnervensystem. *Naturwissenschaften*, 1937, p. 461.
235. LÆWI (O.). — Ueber eine wasserunlösliche Zustandsform des Acetylcholins im Zentralnervensystem des Frosches. *Arch. f. Physiol.*, 1937, 239, 430.
236. LÆWI (O.). — Strychninregung und Acetylcholinegehalt des Zentralnervensystems. *Naturwissenschaften*, 1937, p. 526.
237. LÆWI (O.) und HELLAUER (H.). — The acetylcholine content of the nerves of warm blooded animals. *Jour. of Physiol.*, 1938, 93, proceed. 34 P.
238. LÆWI (O.) und NAVRATIL (S.). — Ueber humorale Uebertragbarkeit der Herznervenwirkung ; über das Schicksal des Vagusstoffes. *Arch. f. Physiol.*, 1926, 214, 678.
239. LÆWI (O.) und NAVRATIL (E.). — Ueber den Mechanismus der Vaguswirkung von Physostigmin und Ergotamin. *Arch. f. Physiol.*, 1926, 214, 689.
240. MANN (P. L.), TENNENBAUM (M.) et QUASTEL (I. H.). — The mechanism of acetylcholine formation in the brain *in vitro*. *Bioch. Jour.*, 1938, 32, 243.
241. MANN (P. L.) and QUASTEL (J. H.). — The oxidation of cholin by rat liver. *Bioch. Jour.*, 1937, 31, 869.

242. MARNAY (A.). — Action de l'acétylcholine sur le muscle isolé. *C. R. Soc. Biol.*, 1937, **125**, 1007.
243. MARNAY (A.). — Action de l'acétylcholine sur le muscle haché. *C. R. Soc. Biol.*, 1937, **125**, 1009.
244. MARNAY (A.). — Cholinestérase dans le muscle strié de Crapaud. *C. R. Soc. Biol.*, 1938, **128**, 290.
245. MARNAY (A.). — Cholinestérase dans le pancréas et la rate de quelques Mammifères. *C. R. Soc. Biol.*, 1938, **128**, 519.
- 245 bis. MARNAY (A.) and NACHMANSOHN (D.). — Cholinesterase in voluntary frog's muscle. *Jour. of Physiol.*, 1937, **89**, 359.
246. MARNAY (A.) et NACHMANSOHN (D.). — Action des substances sympathomimétiques et parasymphomimétiques sur les processus chimiques fournissant l'énergie de la contracture musculaire. II. Action de l'acétylcholine. *Bull. Soc. Chim.*, 1937, **49**, 445.
247. MARNAY (A.) et NACHMANSOHN (D.). — Cholinestérase dans le nerf de Homard. *C. R. Soc. Biol.*, 1937, **125**, 1005.
248. MARNAY (A.) et NACHMANSOHN (D.). — Cholinestérase dans le muscle strié du Chat. *C. R. Soc. Biol.*, 1937, **124**, 446.
249. MARNAY (A.) et NACHMANSOHN (D.). — Cholinestérase dans le muscle strié. *C. R. Soc. Biol.*, 1937, **124**, 942.
250. MARNAY (A.) et NACHMANSOHN (D.). — Cholinestérase dans le muscle strié après dégénérescence du nerf moteur. *C. R. Soc. Biol.*, 1937, **126**, 785.
251. MARTINI (E.) und TORDA (K.). — Die Cholinesterase des denervierten Muskels. *Klin. Woch.*, 1937, 824.
252. MATTHES (K.). — The action of blood on acetylcholine. *Journ. of Physiol.*, 1930, **70**, 338.
- 252 bis. MAXIM (M.) et VASILIU (C.). — Sur la teneur en choline du sang à différents niveaux. *Bull. Soc. Chimie biol.*, 1929, **11**, 70.
253. MENTZER (C.), KASWIN (A.), CORTEGGIANI (E.) et GAUTRELET (J.). — Contribution à l'étude de la choline et de l'acé-

- tylcholine chez les Invertébrés. Recherches dans les organes d'*Helix pomatia*. *C. R. Soc. Biol.*, 1936, **123**, 668.
254. MILLER. — The local action of eserine on the central nervous system. *Jour. of Physiol.*, 1937, **91**, 212.
255. MINZ (B.). — Pharmakologische Untersuchungen am Blutegelpräparat; zugleich eine Methode zum biologischen Nachweis von Acetylcholin bei Anwesenheit anderer pharmacologisch wirksamer körpereigener Stoffe. *Arch. f. exp. Path.*, 1932, **168**, 292.
256. MINZ (B.). — Sur la libération par la moelle épinière d'un corps du type de l'acétylcholine. *C. R. Soc. Biol.*, 1936, **122**, 1214.
257. MINZ (B.). — Sur la libération de la vitamine B1 par le tronc isolé du nerf pneumogastrique soumis à l'excitation électrique. *C. R. Soc. Biol.*, 1938, **127**, 1251.
258. MINZ (B.). — Le rôle de la vitamine B1 dans la régulation humorale du système nerveux. *Presse médicale*, 1938, 1406.
259. MORIN (G.). — La motricité gastrointestinale chez les Mammifères. 12^e réunion de l'Ass. des Physiol., Louvain, 1938. *Ann. Physiol.*, 1938, **14**, 321.
260. MORIN (G.) et JULLIEN (A.). — Recherches sur l'automatisme du cœur isolé de *Murex tr.* *Arch. Int. Physiol.*, 1932, **35**, 143.
261. MORIN (G.) et JULLIEN (A.). — Sur la structure du cœur chez *Murex trunculus*. *Bull. Hist. Appl.*, 1930, **7**, 79.
262. NACHMANSOHN (D.). — La transmission de l'influx nerveux dans le système nerveux central. *C. R. Soc. Biol.*, 1937, **126**, 783.
263. NACHMANSOHN (D.). — Cholinestérase dans les tissus embryonnaires. *C. R. Soc. Biol.*, 1938, **127**, 670.
264. NACHMANSOHN (D.). — Cholinestérase dans le tissu nerveux. *C. R. Soc. Biol.*, 1938, **127**, 894.
265. NACHMANSOHN (D.). — Distribution de la cholinestérase dans le cerveau humain. *C. R. Soc. Biol.*, 1938, **128**, 24.

266. NACHMANSOHN (D.). — Changements de la cholinestérase dans le muscle strié. *C. R. Soc. Biol.*, 1938, **128**, 599.
267. NACHMANSOHN (D.). — Cholinestérase dans les fibres nerveuses. *C. R. Soc. Biol.*, 1938, **128**, 516.
268. NACHMANSOHN (D.). — Cholinestérase dans le système nerveux central. *16^e Congrès Int. de Physiol.*, 1938, Zürich.
269. NACHMANSOHN (D.) et BACQ (Z. M.). — Cholinestérase dans les muscles des Crustacés. *Journ. of Physiol.*, 1937, **89**, 368.
270. NÖLL (H.). — Eine neue Klasse Cholinester (Carbaminoylcholine oder Lentin). II. Mitteilung. Wirkung auf Blutdruck, Darm, Verdauungsdrüsen und Schicksal in Organismus. *Arch. f. exp. Path. Pharmac.*, 1932, **167**, 158.
271. NOTHNAGEL (G.). — Ueber Cholin und verwandte Verbindungen mit besonderer Berücksichtigung des Muskarins. *Arch. d. Pharmazie*, 1894, **232**, 261.
272. GETTINGEN (V.) and BOWMAN. — The physico-chemical properties of some new choline derivatives in relation to their chemical constitution and pharmacologic action. *Journ. of Pharm.*, 1933, **48**, 333.
273. PAGE (I. H.) und SCHMIDT. — Schicksal des Cholins in Organismus. *Zeits. f. Physiol. Chem.*, 1930, **191**, 262.
274. PANTIN (C. F. A.). — On the excitation of crustacean muscle. *Jour. exp. Biol.*, 1936, **13**, 111.
275. PLATTNER (F.). — Acetylcholinartige Substanz in den Nebennieren und in einigen anderen Organen. *Arch. f. Physiol.*, 1934, **234**, 258.
276. PLATTNER (F.) und GALEHR (O.). — Ueber das Schicksal des Acetylcholins im Blute. VI. Der Einfluss verschiedener Narkotica auf die Spaltung des Acetylcholins. *Arch. f. Physiol.*, 1928, **220**, 606.
277. PLATTNER (F.) und HINTNER (H.). — Die Spaltung von Acetylcholin durch Organextrakte und Körperflüssigkeiten. *Arch. f. Physiol.*, 1930, **225**, 19.

278. PLATTNER (F.), GALEHR (O.) und KODERA. — Ueber das Schicksal des Acetylcholins im Blut. *Pflüg. Arch. Ges. Phys.*, 1928, 219, 678.
279. PLATTNER (F.) und KRANNICH (E.). — Ueber das Vorkommen eines acetylcholinartigen Körpers in den Skelettmuskeln. *Arch. f. Physiol.*, 1932, 229, 730 ; 230, 356 ; 230, 705 ; et 1933, 232, 342.
280. PLATTNER (F.) und TSUDZIMURA (H.). — Acetylcholin und Cholin in Organextrakten. *Arch. f. Physiol.*, 1935, 236, 173.
281. POMPILIAN (M.). — Cellules nerveuses du cœur de l'Escargot. *C. R. Soc. Biol.*, 1900, 52, 185.
282. QUASTEL (J. H.). — Biochemistry and mental disorder. Perspectives in Biochemistry. *Cambridge*, 1937, p. 296.
283. QUASTEL (J. H.), TENNENBAUM (M.) and WHEATLEY (A. H. M.). — Choline-ester formation in and cholinesterase activities of tissues *in vitro*. *Bioch. Journ.*, 1936, 30, 1668.
284. QUASTEL (J. H.) and WHEATLEY (D. H.). — Narcosis and oxydations of the brain. *Proc. Roy. Soc.*, 1932, B, 112, 60.
285. RICHET (C.). — Contribution à la physiologie des centres nerveux et des muscles de l'Ecrevisse. *Arch. Physiol. norm. et path.*, 1879, 6, 262, 522.
286. RIESSER (O.). — Theoretische und Experimentelles zur Frage der Kreatinbildung im tierischer Organismus. *Zeits. f. Physiol. Chem.*, 1913, 86, 415.
287. RIESSER (O.). — Weitere Beiträge zur Frage der Kreatinbildung aus Cholin und Betain. *Zeits. f. Phys. Chem.*, 1914, 90, 221.
288. RIESSER (O.). — Ueber die durch Acetylcholin bewirkte Erregungskontraktur des Froschmuskels und ihre antagonistische Beeinflussung durch Atropin, Novakain und Kurare. *Arch. f. exp. Path.*, 1921, 91, 342.
289. RIESSER (O.). — Beiträge zur Kenntnis des Acetylcholins. *Arch. f. exp. path.*, 1931, 159, 34.

290. ROMAN. — Eine chemische Method zur quantitativen Bestimmung des Cholins. *Bioch. Zeitschr.*, 1930, **249**, 218.
291. SCHWEITER (A.) and WRIGHT (S.). — The action of eserine and related compounds and of acetylcholine on the central nervous system. *Journ. of Physiol.*, 1937, **89**, 165.
- 291 bis. SHARPE (S.). — A method for quantitative estimation of choline in blood. *Bioch. Journ.*, 1923, **17**, 41.
292. SIMONART (A.). — Contribution à l'étude des propriétés pharmacologiques des dérivés de la choline. *Revue Belge des Sciences médicales*, 1933, **5**, 73. — *Jour. Pharmacol.*, 1932, **46**, 157.
293. SIMONART (A.). — Contribution à l'étude de l'hydrolyse de l'acétylcholine par voie fermentaire. *Revue Belge des Sciences médicales*, 1931, **3**, 1.
294. SMORODINZEW (J.). — Ueber die Stickstoffhaltigen Extraktivstoffe der Leber. *Zeits. f. Phys. chem.*, 1912, **80**, 218.
- 294 bis. STEDMAN (E. and El.). — The relative choline-esterase activity of serum and corpuscles of certain species. *Bioch. Jour.*, 1935, **29**, 2107.
295. STEDMAN (E.) and STEDMAN (El.). — Studies on the relationship between chemical constitution and physiological action. III et IV. The inhibitory action of certain synthetic urethanes on the activity of liver esterase. *Bioch. Journ.*, 1931, **25**, 1147 ; et 1932, **26**, 1214.
296. STEDMAN (Ed. et El.) and EASSON (L. H.). — Cholinesterase. An enzyme present in the blood serum of the horse. *Bioch. Jour.*, 1932, **26**, 2056.
298. STEDMAN (E.). — The cholinesterase content of blood in myasthenia gravis. *Jour. of Physiol.*, 1935, **84**, 56 P.
299. STEDMAN (Ed. et El.). — The formation of acetylcholine by brain tissue. *Jour. of Physiol.*, 1937, **89**, 37 P.
300. STEDMAN (E.) and STEDMAN (E.). — The mechanism of the biological synthesis of acetylcholin. I. The isolation of acetylcholin produced by brain tissue *in vitro*. *Bioch. Journ.*, 1937, **31**, 817.

301. STRACK (E.), NEUBAUER (E.) und GEISSENDÖRFER (H.). — Ueber den Cholin bzw. Acetylcholingehalt der menschlichen Placenta. *Ztsch. f. Physiol. Chem.*, 1934, 239, I, 25.
302. STRACK (E.), NEUBAUER (E.) und GEISSENDÖRFER (H.). — Ueber Cholingehalt bzw. Acetylcholingehalt tierischer Gewebe. *Ztsch. f. Physiol. Chem.*, 1933, 220, 217.
- 302 bis. STRACK (E.), WÖRDEHOFF (P.), NEUBAUER (E.) und GEISSENDÖRFER (H.). — Ueber den Gehalt von Cholin, Acetylcholin, und Carnitin im Muskel. *Ztschr. f. phys. Chem.*, 1935, 233, 189.
303. STUDER (A.) et WEGER (P.). — Purification de la substance vaso-dilatatrice contenue dans les globules rouges. *C. R. Ass. libre Physiologistes Suisses*, 1937, Juin, p. 22.
304. TEISSIER (J.) et MOREL (A.). — Résultats de la recherche de la choline dans le sang des sujets hypotendus. *Lyon médical*, 1909, 113, 916.
305. TESCHENDORF. — Beiträge zur Physiologie und Pharmakologie der Blutergelmuskulatur. *Arch. f. Physiol.*, 1921, 192, 135.
306. THOMAS (J.) et NACHMANSOHN (D.). — La cholinestérase dans les cultures du cœur de l'embryon de Poule. *C. R. Soc. Biol.*, 1938, 128, p. 577.
307. TIEFFENEAU (M.). — Sur les complexes formés par l'acétylcholine et l'adrénaline avec les constituants du sérum. *Soc. Chimie Biol.*, 19 nov. 1935. — *Bull. Soc. Chimie biol.*, 1935, 17, 1647.
308. TOURNADE et CHEVILLOT. — Influence de l'ésérine sur l'adrénalino-sécrétion déclenchée par l'excitation des nerfs splanchniques et par l'injection intraveineuse d'acétylcholine. *C. R. Soc. Biol.*, 1937, 124, 565.
309. VELTEN (W.). — Eine neue Klasse Cholinester. III. Mitteilung. Wirkung auf Magen und Uterusmuskulatur, auf den Blutzuckerspiegel und die Frage der Gewöhnung oder Kumulation. *Arch. f. exp. Path. Pharmac.*, 1933, 169, 223.

310. VERTIAINEN (A.). — The sensitization of leech muscle to barium by eserine. *Jour. of Physiol.*, 1933, 80, 21 P.
311. VIALE (G.). — Fonction cholinogène des surrénales. *C. R. Soc. Biol.*, 1928, 93, 177.
312. VIALE (G.) et COMBES (T.). — Choline et capsule surrénale. *C. R. Soc. Biol.*, 1929, 102, 461.
313. VILLARET (M.), JUSTIN-BESANÇON et CACHERA. — Recherches expérimentales sur quelques esters de la choline. Paris, Masson, 1934.
314. VILLARET (M.), JUSTIN-BESANÇON, CACHERA et SAID. — Recherches préliminaires concernant l'action de la méthylacétylcholine chez les sujets normaux. *Annales de Médecine*, 1932, 32, 385.
315. VINCENT (D.). — Dosage des esters de la choline dans les ganglions sympathiques humains. *C. R. Soc. Biol.*, 1938, 128, 683.
316. VINCENT (D.). — Dosages de l'acétylcholine et de la choline dans les tissus du Cobaye après injections de fortes doses de chlorure d'acétylcholine. *Soc. de Biol.*, Lyon, 24 oct. 1938.
317. VINCENT (D.) et JULLIEN (A.). — La teneur en acétylcholine du cœur des Mollusques. *C. R. Soc. Biol.*, 1938, 127, 334.
318. VINCENT (D.) et JULLIEN (A.). — Contribution à l'étude de la cholinestérase chez les Invertébrés. La cholinestérase de l'hémolymph des Mollusques. *C. R. Soc. Biol.*, 1938, 127, 628.
319. VINCENT (D.) et JULLIEN (A.). — L'activité cholinestérasique des extraits myocardiques chez les Mollusques. *C. R. Soc. Biol.*, 1938, 127, 631.
320. VINCENT (D.) et JULLIEN (A.). — Richesse de la glande à pourpre des *Murex* en esters de la choline. *C. R. Soc. Biol.*, 1938, 127, 1506.
321. VINCENT (D.) et JULLIEN (A.). — Sur la teneur des divers organes de *Murex* en esters de la choline. *Soc. Biol.*, Lyon, 20 Juin 1938.

322. VINCENT (D.) et JULLIEN (A.). — Recherches sur les esters de la choline chez les Mollusques. Esters de la choline du myocarde. Activité cholinestérasique du myocarde et de l'hémolymphe. *Jour. Physiol. et Path. gén.*, 1938 (sous presse).
323. VOGELFANGER (I.). — Ueber das Vorkommen von Acetylcholin im Rinderblut. *Ztsch. Physiol. Chem.*, 1933, **244**, 109.
324. WACHOLDER (K.) und MATTHIAS (F.). — Einfluss verschiedenen zusammengesetzter Ringerlösunge (Sommer und Winterringer usw.) auf das Kontrakturvermögen von Froschmuskeln. *Pflüg. Arch.*, 1933, **232**, 159.
325. WEBSTER (M. D.). — The quantitative action of acetylcholine and histamine on the guinea pig uterus. *Jour. of Physiol.*, 1935, **53**, 340.
326. WILLSTATTER, KUHN, LIND und MEMMEN. — Ueber Hemmung der Leberesterase durch Ketocarbonsäurester. *Zeits. Physiol. Chem.*, 1927, **167**, 303.
327. WITANOWSKI (W. R.). — Ueber humorale Uebertragbarkeit der Herznervenwirkung. *Arch. f. Physiol.*, 1925, **208**, 694.
328. WREDE und KEIL. — Acetylcholin im Rinderblut. *Bioch. Ztsch.*, 1931, **404**, 229.
-

TABLE DES MATIERES

	PAGES
INTRODUCTION	7

Première Partie

REVUE GÉNÉRALE DE LA QUESTION

CHAPITRE I. — <i>Des procédés d'extraction et de dosage de l'acétylcholine dans les tissus animaux</i>	15
Propriétés chimiques	15
Méthodes d'extraction	18
Procédés chimiques d'identification et de dosage	19
Propriétés biologiques	22
Méthodes biologiques de dosage	23
Cœur isolé de Grenouille	23
Pression sanguine	25
Intestin isolé de Cobaye	25
Utérus isolé de Cobaye	26
Gastrocnémien énervé du Chat	26
Muscle <i>rectus abdominis</i> de Grenouille ..	27
Muscle dorsal de Sangsue	28

	PAGES
CHAPITRE II. — <i>Répartition de l'acétylcholine dans le monde animal</i>	35
Chez les Vertébrés	35
Sang	36
Divers organes	38
Chez les Invertébrés	45
CHAPITRE III. — <i>La cholinestérase</i>	49
Modes de détermination de l'activité cholinestérasique	51
Inhibiteurs de la cholinestérase	52
Influences physiques et physicochimiques	52
Influences chimiques	53
Répartition de la cholinestérase dans les organes	54
Nature et rôle de la cholinestérase	57
CHAPITRE IV. — <i>Mode d'action et rôle de l'acétylcholine dans les tissus</i>	59
Les états de l'acétylcholine dans les tissus ..	59
Le rôle de l'acétylcholine dans les tissus	63

Deuxième Partie

RECHERCHES PERSONNELLES

CHAPITRE I. — <i>Les techniques</i>	71
Technique de dosage biologique de l' « A. C.-équivalent » des tissus	71
Préparation du muscle réactif	72
Préparation des extraits	73

	PAGES
Dosage proprement dit	74
Remarques	77
Technique d'appréciation de l'activité cholinestérasique des tissus et humeurs	83
Principe	83
Technique	84
Remarques	86
CHAPITRE II. — <i>Recherches sur la répartition de l'Acétylcholine et de la cholinestérase chez les Mollusques</i>	89
L'acétylcholine dans le cœur des Mollusques	89
L'activité cholinestérasique du myocarde et de l'hémolymphe des Mollusques	95
Sur l'état des esters de la choline dans le cœur de certains Mollusques (<i>Helix pomatia</i> en particulier)	99
I. L'équivalent A. C. constaté dans le cœur d' <i>Helix</i> n'est-il pas dû à l'excitation nerveuse traumatique du prélèvement ?	100
II. L'ester de la choline du cœur d' <i>Helix</i> est-elle libre et diffusible ?	102
— Diffusion de l'A. C. du cœur entier	102
— Diffusion de l'A. C. du cœur après broyage	103
III. Comment l'A. C. du myocarde d' <i>Helix</i> peut-elle coexister avec la cholinestérase de cet organe ?	106

— Expérience de contact A. C. - cholinestérase à travers membrane de collodion en milieu non ésériné.	107
— Conservation de la teneur en acé- tylcholine du cœur d' <i>Helix</i> , 24 heures après prélèvement malgré le maintien en milieu sans ésérine..	110
Essai d'explication de particularités fonction- nelles du cœur chez certains Mollusques ..	112
Mise en évidence de l'effet acétylcholine des extraits du cœur de Mollusques sur le cœur isolé d' <i>Helix pomatia</i>	114
L'acétylcholine dans les divers organes de <i>Murex</i>	117
Animal entier	117
Principaux organes	118
Etude sur la glande à pourpre	120
— identification du produit actif par voie biologique	120
— Essai d'identification chimique ..	124
— Du rôle des esters de la choline dans la glande à pourpre	130
CHAPITRE III. — <i>Recherches sur les esters de la choline et la cholinestérase chez les Crustacés</i> ..	133
Teneur en esters de la choline	135
Système nerveux	135
Autres organes	136
Activité cholinestérasique	136

CHAPITRE IV. — <i>Recherches sur la répartition de l'acétylcholine et de la cholinestérase chez les Vertébrés et sur leur mode d'action biologique..</i>	139
— L'A. C. - équivalent des organes du Cobaye	140
— Données expérimentales sur la destinée de l'acétylcholine injectée dans l'organisme ..	141
Dosage de la choline par acétylation	143
Marche des expériences	145
Résultats	146
Conclusions	151
— Essais d'inactivation de la cholinestérase <i>in vivo</i> chez le Cobaye	152
Recherche de l'Acétylcholine libre dans le sang	152
Essai de détermination d'acétylcholine libre dans le sang chez le Cobaye, après injection d'ésérine	153
Dosages de l'acétylcholine dans le sang après injection sous-cutanée, chez l'animal normal et chez l'animal ésériné ..	156
— Détermination de l'A. C. - équivalent et de l'activité cholinestérasique dans quelques organes du système nerveux humain	159
Ganglions sympathiques	160
Système nerveux central	161
CONCLUSIONS	165
BIBLIOGRAPHIE	171

DEUXIÈME THESE

Propositions données par la Faculté :
L'Acétylcholine chez les végétaux
La biochimie de la vitamine E

Lu et accepté :

Les membres du Jury,

H. CARDOT

C. FROMAGEOT

R. DOUIN

Vu et approuvé :

*Pour le Doyen
de la Faculté des Sciences :*

L'ASSESEUR.

C. VANEY

Vu et permis d'imprimer :

LYON, le 9 novembre 1938.

LE RECTEUR, PRÉSIDENT DU CONSEIL DE L'UNIVERSITÉ,
A. LIRONDELLE

IMPRIMERIE DE TREVoux
G. PATISSIER

1938

